Retraktographische Untersuchungen zur Fibrinolyse

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jürgen Johannes Kuehn

Saarbrücken
1973

Aus der Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Kaiserslautern

Direktor: Prof. Dr. med. H. HARTERT

Retraktographische Untersuchungen zur Fibrinolyse

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von

Jürgen Johannes K u e h n

geb. am 2. 5. 1934 in Frankfurt/Main

Dekan: Prof. Dr. med. G. A. Jutzler

Referent: Prof. Dr. med. H. HARTERT

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.7.73

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Biochemie und Mechanismus der Fibrinolyse-Aktivierung und ihre Hemmung	2
III. Eigene Untersuchungen	
A) Methodik	9
B) Ergebnisse	
1. Zusatz des Fibrinolyse-Aktivators zum Gerinnungsansatz. Vergleichende Untersuchungen im Thrombelastographen	17
Diskussion	20
2. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit dem Fibrinolyse-Aktivator vor Gerinnungseintritt. Vergleichende Untersuchungen im Thrombelastographen	25
Diskussion	29
3. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit dem Fibrinolyse-Aktivator nach Gerinnungseintritt ("Nachüberschichtungsverfahren") Vergleichende Untersuchungen im Thrombelastographen	31
Diskussion	35
Zusammenfassende Diskussion	36

Seite

4. Überschichtung des Gerinnungsansatzes mit durch den Fibrinolyse-Aktivator aktiviertem Plasma nach Gerinnungseintritt 48

Diskussion 49

5. Prüfung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Lysierbarkeit von Gerinnseln.

Retraktographische Untersuchungen 51

Zusammenfassende Diskussion 62

C) Zusammenfassung 63

D) Literaturverzeichnis 68

I. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem speziellen, bisher noch nicht geprüften Anwendungsbereich der Retraktographie nach HARTERT (1960). Zweck der Arbeit war es, ganz allgemein die Brauchbarkeit der retraktographischen Methode für eine Prüfung der fibrinolytischen Aktivität menschlichen Plasmas, dessen Fibrinolysesystem durch verschiedene Substanzen aktiviert wurde, zu untersuchen. Im besonderen sollte der Einfluss einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems auf die Retraktion geprüft werden.

Untersuchungen in dieser Richtung schienen aus zweierlei Gründen interessant und aktuell zu sein:

1. Die Fibrinolyse gewinnt als Thrombolyse, d.h. als wirksame biochemische Handhabe gegen folgenschwere Gefässverschlüsse in Klinik und Forschung ein immer grösseres Interesse.
2. Die Retraktographie nach HARTERT bot sich für die vorliegenden Untersuchungen aus einem besonderen Grunde an: neben dem Vorteil einer graphischen Registrierung thrombolytischer Vorgänge stellt das hierfür benutzte Gerät in gewisser Hinsicht eine Art in-vitro-Modell für die Verhältnisse in vivo dar; ein Gerinnsel - retrahiert oder nicht retrahiert, beides lässt sich prüfen - wird von aussen (in vivo via Blutbahn, in vitro via Nachüberschichtung)

mit einem Fibrinolyse-Aktivator in Kontakt gebracht und die Reaktion beobachtet bzw. graphisch registriert. Dieses Modell einer thrombolytischen Therapie kommt insofern den Verhältnissen in vivo nahe, als bei verschliessenden Thromben in Gefässen das Blut oberhalb des Thrombus in gleicher Weise stillesteht wie in der Küvette des Gerätes die aktivierende Überschichtungsflüssigkeit (DEUTSCH, 1967). Es lassen sich also in begrenztem Umfang aus den Ergebnissen dieser Experimente Rückschlüsse auf die Verhältnisse in vivo ziehen.

Darüber hinaus wird versucht, die retraktographische Methode auf ihre Empfindlichkeit gegenüber fibrinolytischer Aktivität zu prüfen, wobei auch eine Abgrenzung gegenüber der Empfindlichkeit der thrombelastographischen Methode erfolgen soll.

II. Biochemie und Mechanismus der Fibrinolyse-Aktivierung und ihre Hemmung.

Anhand eines Schemas (Abb. 1) soll kurz die Biochemie der Aktivierung des fibrinolytischen Systems, deren Kenntnis die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen bildete, dargestellt werden.

Es existieren zwei verschiedene Hypothesen bezüglich des Biochemismus der Fibrinolyse (MARX, 1969). Beiden gemeinsam und unbestritten ist die Tatsache, dass im Blut eines gesunden

Menschen eine inaktive Vorstufe eines zentral wichtigen Enzyms des fibrinolytischen Systems, das Plasminogen, vorhanden ist. Dieses Plasminogen muss auf irgendeine Weise aktiviert werden zu Plasmin. Das aktive Enzym Plasmin ist dann in der Lage, Fibrin zu spalten, d.h. Fibringerinnsel aufzulösen.

Nicht unbestritten ist die Art der Aktivierung des Plasminogens.

Nach ASTRUP und Mitarbeitern (1952) liegt neben einem inaktiven Plasminogen im Plasma noch ein inaktiver selbständiger Proaktivator vor.

Nach KLINE (1963), HEIMBURGER (1962), SPÖTTL und CONSTANTINI (1967) ist das Plasminogen identisch mit dem Proaktivatormolekül ("Proaktivator-Plasminogen", Kurzbezeichnung PP-Molekül). Danach sind die Plasminogen- und Proaktivatoreigenschaften in verschiedenen Aminosäure-Sequenzen ein und desselben Moleküls lokalisiert. Heute erscheint diese letztere Hypothese durch Experimente besser gestützt als die Vorstellung eines selbständigen Proaktivators (MARX, 1969).

Eine Aktivierung dieses PP-Molekül-Enzymsystems kann nach den letztgenannten Vorstellungen auf zwei verschiedene Arten erfolgen:

1. auf indirektem Wege, d.h. durch die Einwirkung der eine Aktivierung auslösenden Substanz (z.B. Streptokinase, Staphylokinase) auf das Proaktivator-Plasminogen, wobei aus diesem PP-Molekül durch Anlagerungen der betreffenden Substanz der sogenannte Aktivator entsteht. Bei dem Akti-

vator handelt es sich also, wie in dem Schema dargestellt (Abb. 1), um eine Komplexbildung zwischen der aktivierenden Substanz und dem PP-Molekül. Der Aktivator ist nun seinerseits in der Lage, andere PP-Moleküle in Plasmin umzuwandeln. Man nennt solche Stoffe, die auf dem Umwege über eine Aktivatorbildung zur Plasminentstehung führen, indirekte Aktivatoren (ASTRUP, 1956).

2. Auf direktem Wege, d.h., die Aktivierung auslösende Substanz (z.B. Urokinase) bildet aus dem PP-Molekül ohne Entstehung eines Aktivators direkt aktives Plasmin. Substanzen mit einem solchen Wirkungsmechanismus werden als direkte Aktivatoren bezeichnet (ASTRUP, 1956).

Für die therapeutische Anwendung haben im wesentlichen zwei exogene Aktivatoren des fibrinolytischen Systems an Bedeutung gewonnen: die indirekt aktivierende Streptokinase und die direkt aktivierende Urokinase.

Bei der hier experimentell verwendeten Streptokinase handelt es sich um ein 1933 im Kulturfiltrat ß-hämolysierender Streptokokken von TILLET und GARNER (1933) entdecktes Enzym. Die biochemische Charakterisierung zeigt folgende Daten: Molekulargewicht 47 000, in der Immunelektrophorese Verhalten wie ein Alpha-2-Globulin, die Bausteinanalyse ergibt einen Aufbau nur aus Aminosäuren (SCHWICK, HEIMBURGER, 1967). Bei der Urokinase handelt es sich um ein 1965 von LESUK und Mitarbeitern aus Urin mit hohem Reinheitsgrad kristallin dargestelltes Enzym mit einem

Molekulargewicht von 53 000.

Seit der therapeutischen Anwendung der Fibrinolyse-Aktivatoren haben Antifibrinolytica, d.h. Stoffe, die die Aktivierung des fibrinolytischen Systems hemmen, bzw. die bereits aufgetretene Aktivierung blockieren, eine zunehmende Bedeutung erlangt. Wie in jedem Enzymsystem sind auch im fibrinolytischen System endogene, d.h. plasmaständige Inhibitoren vorhanden. Für die therapeutische Fibrinolyse von grösserer Bedeutung und bei den nachfolgenden Untersuchungen zur Anwendung gekommen sind aber die exogenen Inhibitoren, die sogenannten Antifibrinolytica.

Zwei solcher Antifibrinolytica sollen aus diesen Gründen hier kurz näher beleuchtet werden.

1. Die Aminomethylcyclohexancarbonsäure, antifibrinolytisch nur als trans-Isomer aktiv ("trans-AMCHA"), greift, wie aus dem Schema (Abb. 1) ersichtlich, an zwei Stellen hemmend in das System ein: in erster Linie agiert trans-AMCHA in therapeutischen Dosen als Antiaktivator, d.h. es verhindert durch Blockierung des Aktivators eine weitere Plasminbildung; bereits gebildetes Plasmin vermag es dagegen nicht zu inaktivieren (HABERLAND, 1967; ANDERSON et al., 1966). In zweiter Linie blockiert es die Einwirkung der direkten (z.B. Urokinase) und indirekten Aktivatoren (z.B. Streptokinase) auf das Plasminogen.

2. Kallikrein-Inhibitoren (z.B. Trasylol) blockieren nicht nur die Aktivatorwirkung, sondern vermögen darüber hinaus vor allem das Plasmin selbst zu inaktivieren, wirken also vor-

wiegend als Anti-Plasmine (SCHMUTZLER et al., 1962; BECK et al., 1963; MAKI et al., 1966; MARX, 1968).

Da für einen Teil der nachfolgenden eigenen Untersuchungen die Vorstellungen über den Mechanismus der Fibrinolyse den Ausgangspunkt bildeten, sollen diese Vorstellungen hier ebenfalls kurz dargestellt werden.

Im wesentlichen werden zur Zeit drei Haupttheorien neben einer Reihe von Modifikationen diskutiert:

1. Die endogene Lyse des Gerinnsels.
2. Die exogene Lyse des Gerinnsels,
3. die kombinierte endogene und exogene Lyse des Gerinnsels (MARX, 1969).

Die endogene Lyse soll dadurch zustande kommen, dass die Aktivatoren der Fibrinolyse, wie z.B. Streptokinase und Urokinase, per diffusionem in den Thrombus eindringen, im Thrombus das an das Thrombusfibrin primär adsorbierte (DUDOK de WIT, 1962) oder sekundär in den Thrombus hinein diffundierte (OGSTON et al., 1965) Plasminogen aktivieren und auf diese Weise eine Lyse von innen in Gang bringen (AMBRUS et al., 1966). Das Eindringen von radioaktiv markierter Streptokinase konnte bewiesen werden (GROSS, 1963; LUDWIG, 1964). Ob auch spreptokinaseaktivierter PP-Komplex, d.h. Aktivator in den Thrombus eindringen kann, scheint noch nicht eindeutig geklärt zu sein (BENEKE, 1967). Fest steht jedoch, dass die relativ geringen an das Fibrin adsorbierten Plasminogenmengen (etwa 3% des Gesamtplasminogen-

gehaltes) (OGSTON et al., 1965; HEDNER et al., 1967) ausreichen, um eine Lyse zu erreichen. Nach GOTTLOB und BLÜMEL (1966, 1968) verliert das Gerinnsel in den ersten 24 bis 48 Stunden während der Retraktion mit dem ausgepressten Serum einen grossen Teil seines Plasminogengehaltes, um aus dem umgebenden Serum solches später wieder aufzunehmen, womit eine bessere Lysierbarkeit gealterter Thromben erklärt werden könnte.

Die Theorie der exogenen Lyse fordert eine ausreichend hohe kontinuierlich von aussen an den Thrombus herangeführte aktive Enzymkonzentration, d.h. Plasminkonzentration, die zu einer aussen am Thrombusrand beginnenden Lyse des Gerinnsels führt, während sich im Innern des Thrombus keine entscheidende Enzymaktivierung mit nachfolgender Lyse abspielt.

Nach MARX (1969) wird wahrscheinlich die Vorstellung einer kombinierten endogenen und exogenen Lyse "durch progressive Thrombembase von Streptokinase, PP-Komplex und vielleicht noch von etwas Plasminogen zusammen mit einer allerdings geringen direkten Wirkung freien Plamins am Thrombusrand (bei verminderter Antiplasminaktivität um und im Thrombus)" (zit. nach MARX) den Verhältnissen in vivo am ehesten gerecht.

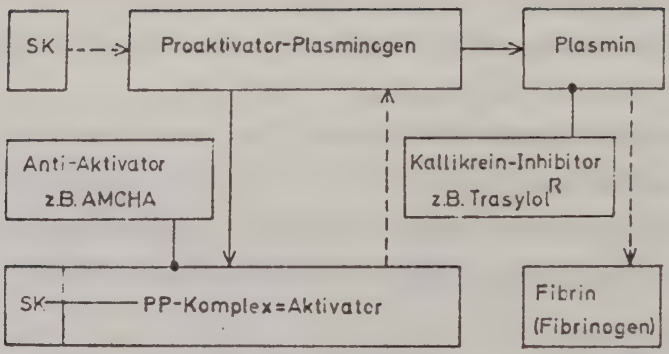

Abb. 1
(modifiziert nach MARX)

-----> wirkt ein auf; ——→ wird zu; ——● hemmt

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A) M e t h o d i k

Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurde die 1960 von HARTERT angegebene Methode der Retraktographie verwendet. Sie arbeitet nach foldendem Prinzip:
Auf dem Boden einer 6 mm hohen Küvette aus nichtrostendem Stahl (nicht benetzbares Material) mit einem Durchmesser von 18 mm (Innenmasse) ruht mit zwei spitzen Enden eine schmale Platte (ebenfalls aus nicht benetzbarem Material) wie eine "halbgeöffnete Falltür". Die Platte ist fest verbunden mit einem Rahmen, der als Waagebalken fungiert. Zusammen bilden diese Teile eine kleine Waage, bei der die virtuelle Drehachse durch die Spitzen am Ende der Platte läuft, die auf dem Behältergrund ruhen und bei der der Schwerpunkt direkt unter der Drehachse liegt. Die Platte wird am freien Ende durch die Gerinnselretraktion heruntergezogen in Richtung auf den Behälterboden. Der Rahmen kippt aus seiner vertikalen Lage sinngemäss mit. Ein Spiegel in der Drehachse des waage-artigen Gebildes erlaubt eine fortlaufende photokymographische Aufzeichnung. Die Summe der Kräfte, die an der Platte ziehen, liegt bei 1 000 dyn/qcm.

Durch Überschichtung des zu untersuchenden Blutes oder Plasmas mit einer spezifisch leichteren plasmafreundlichen Elektrolytlösung wird die Ausbildung eines Oberflächenhäutchens bei der Gerinnung vermieden (HARTERT, 1960; KRIESSMANN, 1962). Bildet sich nämlich ein solches Oberflächenhäutchen bei nicht erfolgter Über-

schichtung aus, so ist das Auspressen von Serum und damit die Retraktion erst nach Sprengen dieses Häutchens möglich, womit die Messung nur verzögert einsetzen kann (HARTERT, 1960; KRIESS-MANN, 1962).

Im einzelnen wurden folgende Ansätze gewählt:

0,6 ml thrombocytenhaltiges Plasma (gewonnen durch 2-minütiges Zentrifugieren von Citratblut bei 2 000 UPM; 9 ml Blut wurden mit 1 ml 3,8%igem Natrium citricum ungerinnbar gemacht).

0,4 ml Calciumchlorid m/40 isotonisch (mit Natriumchlorid versetzt) zur Rekalzifizierung.

Die vergleichenden Ansätze im Thrombelastographen wurden mit den gleichen Mengen vorgenommen.

Die Einfüllmenge in die Küvette des Retraktographen betrug immer 0,6 ml. Mit der Rekalzifizierung wurde eine Stoppuhr in Gang gesetzt, die erst wieder angehalten wurde, nachdem durch Lösen einer Rahmenarretierung die Aufzeichnung bei gleichzeitig eingeschaltetem Filmtransport beginnen konnte. Die Zeit von der Rekalzifizierung bis zur Entarretierung wurde als "Einfüllzeit" notiert.

Die Einfüllmenge in die Küvette des Thrombelastographen betrug, wenn nicht besonders vermerkt, 0,36 ml.

Überschichtung

in etwa 100 orientierenden Vorversuchen wurde das für die entsprechende Fragestellung jeweils ideale Überschichtungsverfahren erarbeitet.

Folgende Verfahren der Überschichtung kamen zur Anwendung:

1. Sofort nach Einfüllen des Plasmas in die Küvette wurde mit 0,75 ml auf 37°C angewärmter physiologischer Kochsalzlösung überschichtet. Anschliessend erfolgte sofort die Rahmenentarretierung, so dass bei eingeschaltetem Filmtransport die Aufzeichnung beginnen konnte. Dabei zeigte es sich aber, dass diese Überschichtungsart nicht für Langzeitversuche geeignet war, da nach etwa 90 Minuten Zeichen der Eintrockung auftraten. Darüber hinaus war eine wichtige Forderung hiermit nicht erfüllbar, nämlich die erst n a c h Gerinnungseintritt erfolgende Überschichtung. Aus diesem Grunde wurde für die weitaus meisten Fälle folgendes "Nachüberschichtungsverfahren" entwickelt:

2. Sofort nach Einfüllen des Plasmas in die Küvette erfolgt eine Überschichtung mit 0,25 ml auf 37°C angewärmter physiologischer Kochsalzlösung. Nach Ablauf von 10 Minuten, gerechnet vom Zeitpunkt der Rekalzifizierung, wurde mit weiteren 0,25 ml auf 37°C angewärmter physiologischer Kochsalzlösung, in der die zu testende Substanz (z.B. Streptokinase) enthalten war, nachüberschichtet. Anschliessend wurde mit 0,5ml Paraffinöl abgedeckt und erst danach die Rahmenarretierung gelöst, so dass die

Retraktion beginnen konnte. Zur Feststellung der "Gerinnungszeit", die bei diesem Vorgehen nicht zur Aufzeichnung kam, wurde der von dem Ansatzgemisch zurückbehaltene Rest in einem Wasserbad von 37°C verbracht und dort bis zum Gerinnungseintritt beobachtet. Die Gerinnung war im allgemeinen um die 5. Minute herum eingetreten.

Auf diese Weise war zweierlei gewährleistet:
Erstens konnte n a c h Gerinnungseintritt eine Nachüberschichtung mit einer Flüssigkeit, die die Testsubstanz enthielt, vorgenommen werden, ohne dass sich an der Gerinnseloberfläche ein Oberflächenhäutchen ausbilden konnte (bei 80 Vorversuchen erwies sich die Nachüberschichtung im entarretierten Zustand als eine nicht sicher vorhersehbare Beeinflussung des Kurvenverlaufes).

Zweitens war so - entsprechend dem Vorbild im Thrombelastographen - eine Eintrockung nicht mehr und eine Langzeitaufzeichnung ohne weiteres möglich.

Eine Beeinflussung des Kurvenverlaufes, insbesondere der Kurvenhöhe durch die über 10 Minuten beibehaltene Arretierung bzw. Blockierung der Retraktion kommt, wie frühere Untersuchungen von KRIESSMANN(1962) gezeigt haben, nicht zustande.

Die Überschichtung selbst erfolgte auf folgende Weise:
Das besonders dünn ausgezogane Ausflussende einer 0,5 ml-Pipette wurde so auf den oberen Küvettenrand aufgelegt,

dass die Überschichtungsflüssigkeit entlang der inneren Küvettenwand langsam auslaufen konnte.

Auswertung:

Nach HARTERT (1960) lässt sich das Retraktogramm in folgende Phasen einteilen:

1. Vorphase (V-Zeit):
   Sie entspricht dem Geschehen vom Zeitpunkt der Rekalzifizierung bis zum Beginn der Retraktion.
2. Hauptphase:
   Sie besteht aus einem ersten Teil der zunehmenden Retraktionsbeschleunigung und einem zweiten Teil der nachlassenden Retraktionsgeschwindigkeit bis zum Retraktionsmaximum.
3. Daran schliesst sich eine Phase der "Ruhe" und an diese Phase eine der "Erschlaffung" an. Weitere Angaben bezüglich der Auswertung finden sich bei KRIESSMANN, A.: Inaug.Diss., Heidelberg 1962.

Die Auswertung der bei den nachfolgenden Untersuchungen erhaltenen Kurven beschränkte sich auf folgende Grössen:

1. Maximale Amplitude (maximale Retraktion) in Millimetern.
2. Lysezeit: vom Zeitpunkt der Rekalzifizierung bis zur Rückkehr des Kurvenschenkels zur Nullinie registrierte Zeitdauer in Minuten, d.h. die Zeitdauer bis zur vollständigen Lyse eines Gerinnsels.

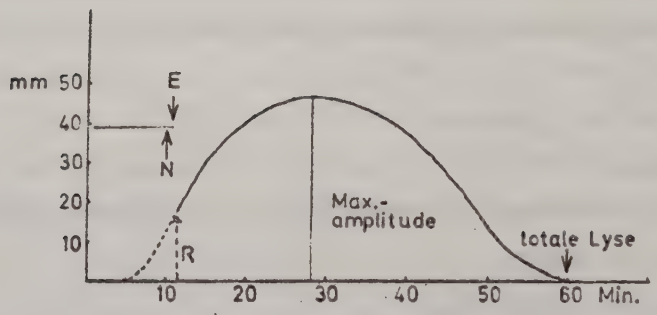

Abb. 2

N Zeitpunkt der Nachüberschichtung;

E Zeitpunkt der Entarretierung;

R Steiler Kurvenanstieg durch Freigeben der bis dahin blockierten Retraktion (Entarretierung)

Der gestrichelte Kurventeil zeigt den Kurvenablauf bei s o f o r t i g e r Entarretierung nach Einfüllen in die Küvette.

Abb. 2 zeigt eine typische Nachüberschichtungskurve mit den entsprechenden Zeitmarken. Der Ansatz dieser Kurve war folgendermassen:

0,6 ml Plasma

0,1 ml physiologische Kochsalzlösung mit 10 I.E. Streptokinase

0,4 ml Calciumchlorid m/40 isotonisch.

Die Einfüllmenge betrug 0,6 ml, nach dem Einfüllen wurde sofort mit 0,25 ml physiologischer Kochsalzlösung überschichtet. Nach

10 Minuten erfolgte dann die Nachüberschichtung mit weiteren 0,25 ml physiologischer Kochsalzlösung und Abdecken mit 0,5 ml Paraffinöl. Dann erst wurde entarretiert, d.h. die Retraktion konnte jetzt beginnen.

Die Auswertung der zum Vergleich herangezogenen thrombelastographischen Kurven erfolgte auf folgende Weise:

1. Maximale Amplitude in Millimetern.
2. Lysezeit: Zeitspanne von der Rekalzifizierung bis zur vollständigen Wiedervereinigung beider Kurvenschenkel, d.h. bis zur vollständigen Lyse des Gerinnsels.

Reagenzien und Material.

Als Fibrinolyse-Aktivator wurde in den meisten Fällen Streptokinase (Streptase der BEHRING WERKE Marburg) verwendet, als Lösungsmittel physiologische Kochsalzlösung. Von anderen Fibrinolyse-Aktivatoren kam bei einigen Versuchen Urokinase (Urokinase GREEN CROSS) und Orthothymotinsäure zur Anwendung. Lösungsvermittler und molare Konzentration der Aktivatoren werden an entsprechender Stelle angegeben.

Als Antifibrinolytica wurden Trasylol (BAYER) und trans-AMCHA (Anvitoff von KNOLL) verwendet.

Die Überschichtung der retraktographischen und thrombelastographischen Ansätze zum Schutz gegen Eintrocknung erfolgte mit Paraffinum liquidum purum.

Die Blutentnahme wurde mittels Einmal-Injektionskanülen und Einmal-Plastikspritzen vorgenommen. Blutspender war immer die

gleiche gesunde Person.

Der Behälter (Küvette) und die Platte des Retraktographen sowie Küvette und Stempel des Thrombelastographen wurden mit einer Mischung aus in Leitungswasser gelöstem Barium sulfatum purum und einer Seifenlauge gereinigt, anschliessend gründlich mit Leitungswasser nachgespült und mit fettfreiem Tupfer trocken gewischt.

B. Ergebnisse

1. Zusatz des Fibrinolyse-Aktivators zum Gerinnungsansatz. Vergleichende Untersuchungen im Thrombelastographen.

Die Ansätze für das Retraktogramm und das Thrombelastogramm wurden wie folgt gewählt:
0,6 ml Plasma
0,1 ml Streptokinase-Lösung unterschiedlicher Konzentration
0,4 ml $CaCl_2$ m/40 isotonisch.
Die "Leerwerte" enthalten anstelle von 0,1 ml Streptokinase-Lösung 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung.

Für die vergleichenden Ansätze im Retraktographen und im Thromelastographen wurde immer das gleiche Plasma verwendet.

Geprüft wurden Streptokinase-Dosen von 10, 15, 20 und 50 I.E. pro Ansatz.
Es ergab sich also z.B. bei der Verwendung einer Spreptokinase-Lösung mit 10 I.E. ein Mengenverhältnis von 0,6 ml Plasma zu 10 I.E. Streptokinase im Ansatz. Umgerechnet auf die Verhältnisse beim Menschen (eine Gesamtblutmenge von 5 000 ml bei einem Hämatokrit von 45% zu Grunde gelegt) würde das eine Dosis von etwa 37 000 I.E. Streptokinase bedeuten. Nach heute allgemein anerkannter Auffassung entspricht dies bei der therapeutischen Anwendung der Streptokinase einer Unterdosierung (Initialdosis heute allgemein mindestens 250 000 I.E. Streptokinase, variiert

je nach Antistreptokinase-Titer, Erhaltungsdosis 90 - 100 000 I.E. pro Stunde).

Diese Dosisberechnung ist insofern von Bedeutung, als mit ihr gleichzeitig die Empfindlichkeit der angewandten Methoden (Retraktographie und Thrombelastographie) für eine Prüfung der Fibrinolysewirkung während einer therapeutischen Anwendung der Streptokinase abgegrenzt wird. Dabei entsprechen erst Dosen von 50 I.E. Streptokinase pro Ansatz etwa dem therapeutischen Bereich.

Die Auswertung der erhaltenen Kurven ergibt Werte, wie sie in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

	Retraktogramm					Thrombelastogramm				
Strept.dosis E pro Ansatz	0	10	15	20	50	0	10	15	20	50
Max.Ampl. in mm	48	45	14	8	2	56	53	23	18	4
Max.Ampl.in %d Leerwertes	100	93	29	18	4	100	94	41	32	7
Lysezeit in Min.	-	64	27	16	5	-	118	41	13	8

Tab. 1

Abb. 3 Setzt die in Tabelle 1 für die Lysezeiten aufgeführten Werte sowohl für das Retraktogramm als auch für das Thrombelastogramm graphisch in Beziehung zur Höhe der Streptokinase-Dosis.

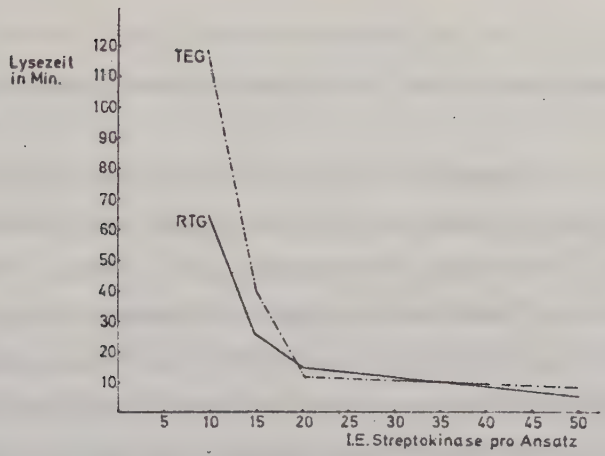

Abb. 3

Abb. 4 zeigt das Verhalten der Maximalamplitude (entsprechend den in Tabelle 1 angegebenen Werten).

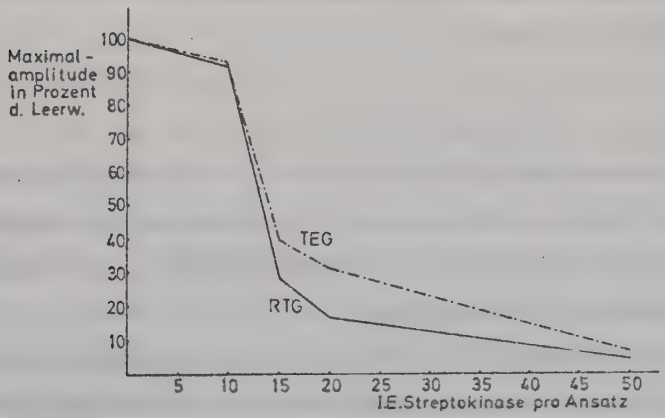

Abb. 4

Diskussion

Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Gesetzmässigkeiten ableiten:

1. Sowohl im Retraktogramm als auch im Thrombelastogramm verkürzen sich die Lysezeiten mit steigender Streptokinase-Dosis, wobei sich für beide Messarten eine asymptotische Annäherung eines Kurvenschenkels an die Abszisse (Streptokinase-Dosis) ergibt; das bedeutet, dass sich mit steigender Streptokinase-Dosis die Lysezeiten relativ weniger stark verkürzen als bei niedrigeren Streptokinase-Dosen. Die stärksten relativen Verkürzungen der Lysezeiten finden sich in dem Bereich zwischen 10 und 20 I.E. Streptokinase pro Ansatz. Bei einer Konzentration von 20 I.E. Streptokinase erfolgt offenbar eine praktisch fast vollständige Aktivierung des gesamten vorhandenen Enzymsystems, dieses wird fast vollständig aufgebraucht. Eine weitere Dosiserhöhung kann aus diesem Grunde keine wesentliche Zunahme der lytischen Aktivität bewirken.

2. Im Bereich niedriger Streptokinase-Dosen (10 und 15 I.E. pro Ansatz) sind die Lysezeiten im Retraktogramm wesentlich kürzer (fast um 50%) als im Thrombelastogramm, während sich bei weiter ansteigenden Streptokinase-Dosen die Lysezeiten einander stark angleichen.
   Hiermit ist die deutlich höhere Empfindlichkeit der retraktographischen Methode gegenüber der thrombelastographischen Methode bei niedrigen Streptokinase-Dosen bezüglich der Be-

einflussung der Lysezeiten aufgezeigt. Mit anderen Worten heisst das, dass relativ geringgradige Aktivierungen des fibrinolytischen Systems im Retraktogramm eher zur Darstellung kommen als im Thrombelastogramm.
Inwieweit sich diese Unterschiede bis in Bereiche der Diagnostik unterschiedlicher Grade von sekundären oder primären Hyperfibrinolysen (z.B. im Zuge einer Verbrauchskoagulopathie) erstrecken (HAWKEY et al., 1964), konnte hier nicht näher untersucht werden (diagnostischer Bereich).
Bezüglich stärkerer Grade einer Fibrinolyse-Aktivierung zeigen beide Methoden eine etwa gleichgrosse Empfindlichkeit (therapeutischer Bereich).

Eine Erklärung für die höhere Empfindlichkeit der Retraktographie bei einer nur geringgradigen Fibrinolyse-Aktivierung ist möglicherweise in dem Umstand einer im Thrombelastographen durch stärkere mechanische Beanspruchung veränderten Fibrinstruktur (Vergröberung der Fasern) und einer damit schlechteren Lysierbarkeit des Gerinnsels zu sehen (BENEKE, 1967).

3. Der Vergleich zwischen dem Abfall der Maximalamplituden im Retraktogramm und im Thrombelastogramm bei steigenden Streptokinase-Dosen ergibt eine bei beiden Kurvenserien zunehmende Amplitudenverkleinerung. Auch hier findet sich eine asymptotische Annäherung eines Kurvenendes an die Abszisse, was gleichbedeutend ist mit der Tatsache, dass die Verkleinerung der Maximalamplitude mit höheren Streptokinase-Dosen relativ

nicht so stark ausgeprägt ist wie bei niedrigeren Streptokinase-Dosen. Im Bereich von 10 bis 15 I.E. Streptokinase pro Ansatz weisen beide Kurven ihre grösste Steilheit auf, d.h. hier wirkt die Streptokinase am stärksten amplitudenverkleinernd.

4. Streptokinase-Dosen von 10 I.E. pro Ansatz verringern sowohl im Retraktogramm als auch im Thrombelastogramm die Maximalamplitude nur unwesentlich (93 und 94% der Maximalamplitude des Leerwertes). Im Vergleich zur Beeinflussung der Lysezeiten durch kleine Streptokinase-Dosen bedeutet das, dass die Maximalamplitude sowohl im Retraktogramm als auch im Thrombelastogramm viel weniger empfindlich auf eine nur geringgradige Aktivierung des fibrinolytischen Systems reagiert als die Lysezeiten.

5. Mit zunehmender Steigerung der Streptokinase-Dosis zeigt sich eine Divergenz zwischen der Retraktogramm- und der Thrombelastogramm-Kurve, d.h. die Reduktion der Maximalamplitude im Thrombelastogramm ist in diesem Bereich weniger stark ausgeprägt als im Retraktogramm. Die Empfindlichkeit des Retraktogramms in Bezug auf die Maximalamplitude ist also hier im Bereich höherer Streptokinase-Dosen gegenüber dem Thrombelastogramm gesteigert. Das bedeutet, dass die reine Retraktion, wie sie im Retraktographen gemessen wird, besonders durch eine ausgeprägtere Fibrinolyse-Aktivierung stärker gestört wird als die "Thrombuselastizität" im Thrombelasto-

graphen, welche Tatsache zunächst nicht ohne weiteres erklärt werden kann. Man sollte im Gegenteil eher annehmen, dass die mechanische Beanspruchung der Fibrinfasern im Thrombelastographen durch die Drehbewegung der Küvette unter Einfluss der Fibrinolyse zu einer kleineren Maximalamplitude führen müsste. Dass dies nicht so ist, hängt wahrscheinlich mit einer unter der mechanischen Beanspruchung im Thrombelastographen andersgearteten Fibrinbildung zusammen (BENEKE, 1967).
Dieser Tatbestand weist im übrigen deutlich darauf hin, dass die im Thrombelastographen gemessene "Thrombuselastizität" streng zu unterscheiden ist von Retraktionsvorgängen.

Die interessante Frage eines Einflusses der Fibrinolyse-Aktivierung auf die Thrombocyten im Sinne einer Beeinträchtigung ihrer Funktion und einer dadurch bedingten Verschlechterung der Retraktionsfähigkeit steht zur Diskussion und wurde hier nicht geprüft.

Abbildung 5 zeigt den Ablauf der Retraktion ohne (Kurve A) und mit (Kurve B) Streptokinase (10 I.E. pro Ansatz). Man erkennt, dass die Maximalamplitude von Kurve B wenig von derjenigen von Kurve A abweicht. Nach Erreichen der Maximalamplitude setzt ein kontinuierlicher Abfall der Kurvenhöhe in der Weise ein, dass sich dieser Kurventeil symmetrisch verhält zum ersten ansteigenden Teil der Kurve: das bedeutet, dass in diesem Fall die Lyse des Gerinnsels den gleichen Zeitaufwand benötigt wie Thrombusbildung und Retraktion.

Darüberhinaus erweisen sich Geschwindigkeit und Ausmass der Retraktion durch die angegebene Streptokinase-Dosis als nicht beeinträchtigt.

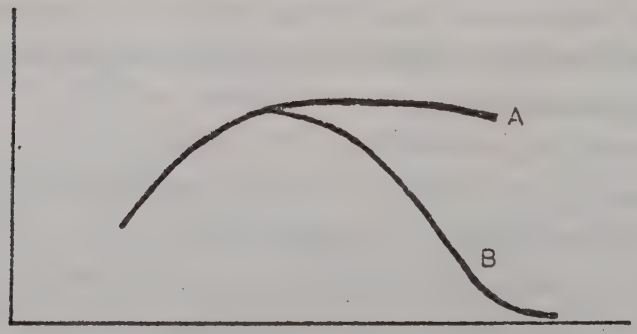

Abb. 5

2. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit dem Fibrinolyse-Aktivator v o r Gerinnungseintritt. Vergleichende Untersuchungen im Thrombelastographen.

Diese zweite Untersuchungsreihe befasst sich mit der Wirkung einer Fibrinolyse-Aktivierung auf die Retraktion bei von aussen mittels Überschichtung erfolgender Einwirkung der Streptokinase bereits v o r Entstehung des Gerinnsels. Sie soll als Grundlage eines Vergleiches dienen zwischen der Lysierbarkeit von Gerinnseln, die bei Zusatz der Streptokinase zum Ansatz entstanden und der Lysierbarkeit von Gerinnseln, die nach Entstehung des Gerinnsels von aussen durch Nachüberschichtung mit Streptokinase in Kontakt gebracht wurden.

Es handelt sich hier ausserdem um Langzeitbeobachtungen bis zu einem Zeitraum von 12 bzw. 24 Stunden. Dass auf diese Weise eine exakte Registrierung und Dokumentation sehr langsam ablaufender Fibrinolyse-Vorgänge möglich ist, soll demonstriert werden.

Geprüft wurden Streptokinase-Dosen von 10, 15, 20 und 50 I.E. pro Ansatz.
Die Ansätze wurden für das Retraktogramm wie folgt gewählt (entsprechend der 1. Untersuchungsreihe):
0,6 ml Plasma
0,1 ml physiologische Kochsalzlösung
0,4 ml $CaCl_2$ isotonisch.

Die Überschichtung im Retraktographen erfolgte sofort, also vor Eintritt der Gerinnung im unterschichteten Plasma, mit 0,5 ml Streptokinase-Lösung. Anschliessend wurde mit 0,5 ml Paraffinöl abgedeckt und die Rahmenarretierung freigegeben, sodass die Retraktion beginnen konnte.

Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte in gleicher Weise wie im Kapitel B, 1. Da jedoch eine vollständige Lyse des Gerinnsels in keinem der Fälle eintrat, konnten Lysezeiten nicht angegeben werden. Ersatzweise wurde der Verlust an Amplitude in Prozent der Maximalamplitude des Leerwertes nach Ablauf von 12 Stunden angegeben.
Schliesslich wurden auch die V-Zeiten (Zeit der Rekalzifizierung bis zum Beginn der Retraktion) ausgemessen.

Die vergleichenden Ansätze im Thrombelastographen entsprachen den Ansätzen im Retraktographen:
0,6 ml Plasma
0,1 ml physiologische Kochsalzlösung
0,4 ml $CaCl_2$ isotonisch

Von diesem Ansatz wurden nur 0,2 ml in die Küvette des Thrombelastographen eingefüllt. Die Aufzeichnung konnte sofort nach Einsenken des Stempels in die Küvette beginnen, wobei auf eine gleichmässige Verteilung des Plasmas am Boden der Küvette geachtet werden musste. Anschliessend wurde mit 0,18 ml physiologischer Kochsalzlösung, die die Streptokinase-Dosen 10, 15, 20 und 50 I.E. pro Ansatz gelöst enthielt (entsprechend den Ansätzen

im Retraktographen), überschichtet. Abschliessend erfolgte die übliche Paraffinöl-Abdeckung. Die angegebenen Mengenverhältnisse wurden in Vorversuchen als ideal befunden bezüglich gleichmässiger Verteilung in der Küvette, Gesamtküvetteninhalt und Überschichtbarkeit.

Wie aus Abbildung 6 erkennbar, kommt es trotz der geringen Plasmamengen in der Küvette (0,2 ml statt der üblichen 0,36 ml) zu ungestörten Kurvenabläufen.

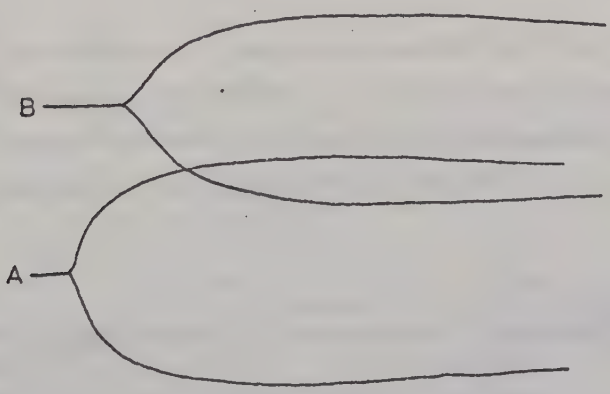

Abb. 6

A = mit physiologischer Kochsalzlösung überschichtet

B = mit Streptokinase,gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, überschichtet.

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die bei dieser Untersuchungsreihe erhaltenen Werte zusammengefasst.

	Retraktogramm					Thrombelastogramm				
Streptdosis E pro Ansatz	0	10	15	20	50	0	10	15	20	50
Max Ampl. in mm	43	43	42	42	35	43	38	38	39	40
Max Ampl. in % d. Leerwertes	100	100	98	98	81	100	88	88	91	93
Ampl. nach 12 Std. in mm	34	34	32	32	25	31	27	25	27	25
Ampl. n. 12 Std. in % d. Leerw.	100	100	94	94	74	100	87	81	87	81
V bzw. r in Min.	6	7	5	7	6	8	7	8	7	5

Tab. 2

In Abb. 7 sind die Maximalamplituden (in Prozent der Maximalamplituden des Leerwertes) der Retraktogramme und Thrombelastogramme in Abhängigkeit von den verschiedenen Streptokinase-Dosen (10, 15, 20, 50 I.E. pro Ansatz) graphisch in Beziehung gesetzt.

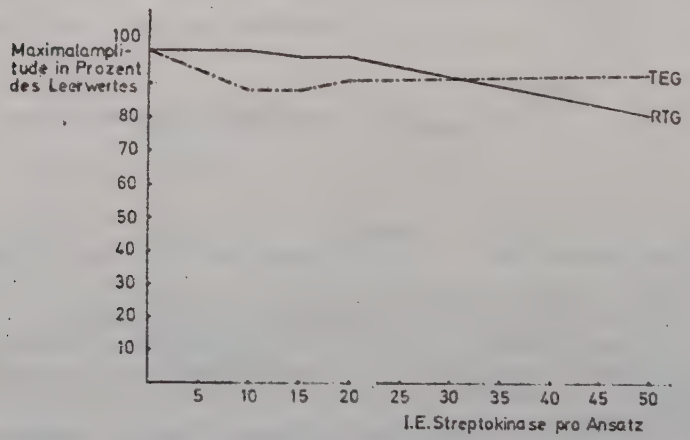

Abb. 7

Abb. 8 zeigt die Abhängigkeit der Amplitudengrösse der Retraktogramme und Thrombelastogramme (in Prozent des Leerwertes) von den verschiedenen Streptokinase-Dosen (10, 15, 20, 50 I.E. pro Ansatz) nach Ablauf von 12 Stunden.

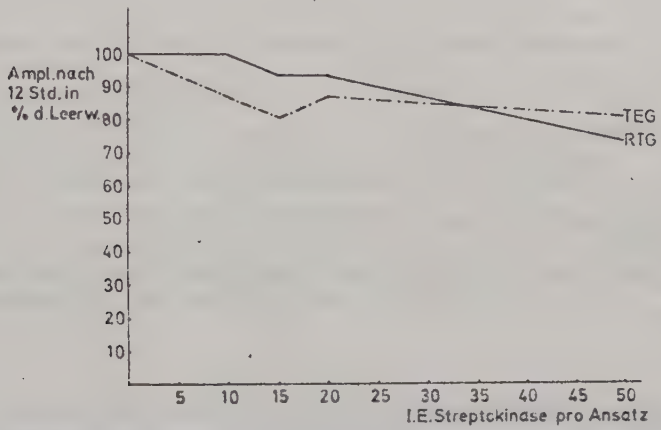

Abb. 8

D i s k u s s i o n

Aus dem Dargestellten lassen sich folgende Tatsachen ableiten:

1. 10, 15 und 20 I.E. Streptokinase, enthalten in der v o r Gerinnungseintritt überschichteten Flüssigkeit, haben keinen Einfluss auf die Grösse der Maximalamplitude im Retraktogramm, d.h. die Retraktion wird in diesem Dosisbereich nicht beeeinträchtigt. Im Thrombelastogramm kommt es bei einer Dosis von 10, 15 und 20 I.E. Streptokinase zu einem geringgradigen Verlust an Maximalamplitude im Vergleich zum Leerwert, wobei diese Abweichung fast ganz innerhalb der normalen Schwankungsbreite (10 %) liegt.

2. Bei einer Streptokinase-Dosis von 50 I.E. pro Ansatz kommt es im Retraktogramm zu einer Verkleinerung der Maximalamplitude von fast 20 %; im Thrombelastogramm zeigt sich auch bei dieser Dosis eine nur ganz geringe Reaktion (7 % Amplitudenverlust). Insgesamt ist der Einfluss auf die Verkleinerung der Maximalamplituden also wesentlich schwächer ausgeprägt als bei Zusatz der Streptokinase zum Gerinnungsansatz. Diese Tatsache ist mit dem Vorhandensein eines Diffussionsfaktors zu erklären: die Streptokinase in der Überschichtungsflüssigkeit muss erst in das Plasma bzw. in das Gerinnsel hineindiffundieren und kann primär nicht ubiquitär wirksam werden.

3. Dass die Streptokinase in das Gerinnsel hineindiffundiert und dort gut lytisch wirksam wird, wird durch Abb. 8 dargelegt. Hier zeigt sich eine annähernd kontinuierliche Zunahme des Lysegrades bei steigenden Streptokinase-Dosen. Allerdings wird bis zu einer Dosis von 50 I.E. Streptokinase pro Ansatz weder im Retraktogramm noch im Thrombelastogramm eine vollständige Lyse des Gerinnsels beobachtet. Sowohl im Retraktogramm als auch im Thrombelastogramm beträgt die Amplitude nach 12 Stunden Einwirkung von 50 I.E. Streptokinase 58 % der Maximalamplitude des zugehörigen Leerwertes, wobei die normalerweise nach 12 Stunden eintretende Erschlaffung, die im Retraktogramm nach diesem Zeitraum eine Amplitude von 79 % der Maximalamplitude des Leerwertes, im Thrombelastogramm von 72 % verursacht, zu berücksichtigen ist. Die durch die Streptokinase bedingte zusätzliche Erschlaffung bzw.

lytische Wirkung in 12 Stunden beträgt also im Retraktogramm 21 %, im Thrombelastogramm 14 %. Daraus lässt sich eine etwas grössere Empfindlichkeit der retraktographischen Methode gegenüber der thrombelastographischen ableiten: die Lysewirkung ist im Retraktogramm etwas stärker als im Thrombelastogramm. Eine plausible Erklärung hierfür ist einmal die wesentlich grössere Diffusionsfläche zwischen Plasma und überschichteter Streptokinase im Retraktographen, bedingt durch den grösseren Durchmesser der Küvette, zum anderen der für das volle Wirksamwerden der Streptokinase kürzere Diffusionsweg in der Retraktographen-Küvette.

3. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit dem Fibrinolyse-Aktivator n a c h Gerinnungseintritt ("Nachüberschichtungsverfahren").
   Vergleichende Untersuchungen im Thrombelastographen.

Eine weitere Versuchsreihe benutzt die retraktographische Methode nach HARTERT als eine Art in-vitro-Modell für die Verhältnisse in vivo; d.h.: das bereits entstandene Gerinnsel wird an seiner Oberfläche sekundär mit dem Fibrinolyse-Aktivator - hier in allen Fällen mit einer Streptokinase-Lösung - in Kontakt gebracht. Praktisch wurde im einzelnen folgendermassen vorgegangen: bei arretiertem Rahmen wird der Gerinnungsansatz in die Küvette gegeben, sofort mit 0,25 ml physiologischer Kochsalzlösung überschichtet und so über 10 Minuten (einschliesslich der Einfüllzeit) belassen. Nach Ablauf dieser Zeit, nach der in jedem Fall die Gerinnung eingetreten war, wurde mit der Streptokinase-

Lösung "nachüberschichtet", mit weiteren 0,5 ml Paraffinöl abgedeckt und die Arretierung gelöst. Die bis dahin blockierte Retraktion wurde damit freigegeben. Dadurch kam es zu einem steilen (fast senkrechten) Kurvenanstieg bis zu dem Punkte der Kurve, der dem Ausmass der Retraktion o h n e Blockierung entsprach (Abb. 2). Es kam also in diesem Zeitraum von 10 Minuten zu keinem Energieverlust, wenigstens nicht zu einem graphisch fassbaren. Die gespeicherte kinetische Energie verwandelt sich ohne Verlust in Bewegung (HARTERT, 1960; KRIESSMANN, 1962).

Die Beobachtungsdauer erstreckte sich auch bei diesen Versuchen wieder auf 12 Stunden. Geprüft wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit die gleichen Streptokinase-Dosen, wie in den beiden bereits beschriebenen Untersuchungsserien: 10, 15, 20 und 50 I.E. Streptokinase pro Ansatz.

Der Gerinnungsansatz für das Retraktogramm war wie folgt:
0,6 ml Citratplasma
0,1 ml physiologische Kochsalzlösung
0,4 ml CaCl m/40 isotonisch

0,1 ml physiologische Kochsalzlösung wurden zugesetzt, um den gleichen Plasmaverdünnungseffekt zu garantieren, wie er in der ersten Versuchsserie durch Zusatz von 0,1 ml Streptokinase-Lösung zustande kam.

Die Ansätze im Thrombelastogramm erfolgten in genau gleicher Weise. Die Einfüllmenge betrug aber, wie bereits beschrieben, nur 0,2 ml. Eine Reihe von Voruntersuchungen hatten gezeigt,

dass die Einfüllmenge von 0,2 ml optimale, praktisch ungestörte Kurvenbilder ergab, obwohl der Stempel nur zu einem Teil in das Plasma eintauchte. Sofort nach Einfüllen dieser Menge wurde der Stempel in die Küvette gesenkt und dabei darauf geachtet, dass die Verteilung der kleinen Plasmamenge am Grund der Küvette gleichmässig war. Die Aufzeichnungsvorrichtung war jetzt eingeschaltet. Anschliessend wurden 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung überschichtet (langsames Einlaufenlassen entlang der Küvettenwand zur Vermeidung einer Durchmischung mit dem Plasma, entsprechend dem Vorgehen bei dem Ansetzen der Retraktogramme). Nach Ablauf von 10 Minuten (einschliesslich Einfüllzeit) erfolgte eine "Nachüberschichtung" mit 0,8 ml Streptokinase-Lösung in den Dosen 10, 15, 20 und 50 I.E. Erst danach wurde mit Paraffin in üblicher Weise abgedeckt. 0,18 ml als Gesamtüberschichtungsmenge wurde gewählt, weil auf diese Weise die Küvette mit einer Gesamtmenge von 0,38 ml so gefüllt war, dass eine Paraffinabdeckung noch möglich war.

In Tabelle 3 sind die erhaltenen Werte zusammengefasst.

	Retraktogramm					Thrombelastogramm				
SK-Dosis E pro Ansatz	0	10	15	20	50	0	10	15	20	50
Max.Ampl. in mm	43	38	35	32	33	49	39	41	38	42
Max.Ampl. in %d.Leerwertes	100	88	81	74	77	100	80	84	78	86
Ampl.nach 12 Std.in mm	34	29	27	24	24	39	28	25	23	21
Ampl.n.12Std. in%d.Leerw.	100	85	79	70	70	100	71	64	59	54

Tab. 3

In Abb. 9 sind die in der Tabelle 3 zusammengefassten Werte für die Maximalamplituden in Prozent des Leerwertes, der als 100 % gesetzt wurde, graphisch in Beziehung gesetzt zu den verschiedenen Streptokinase-Überschichtungsdosen (entsprechend Abb. 4).

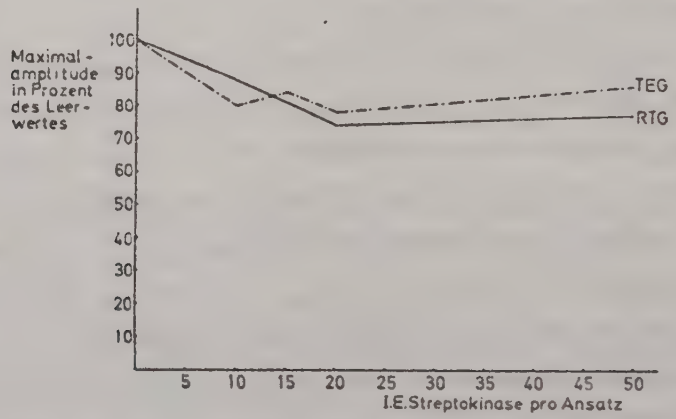

Abb. 9

Abb. 10 zeigt in graphischer Darstellung die Beziehung zwischen dem Amplitudenverlust der Kurven nach 12 Stunden Beobachtungsdauer und den einzelnen Streptokinase-Nachüberschichtungsdosen, wobei als 100%-Wert der Amplitudenverlust der Kurven ohne Streptokinase nach 12 Stunden zum Vergleich herangezogen wurde .

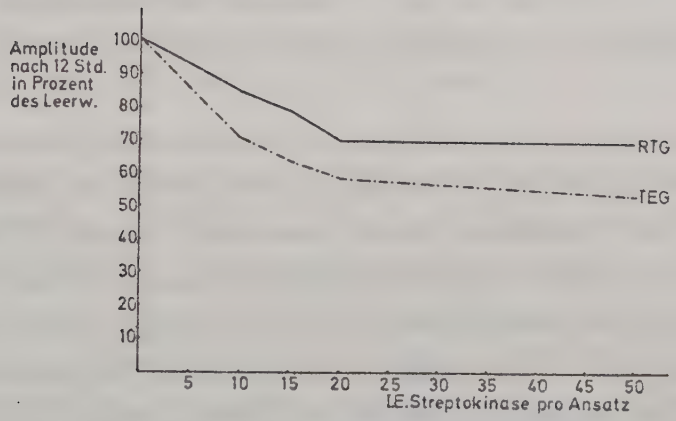

Abb. 10

D i s k u s s i o n

Anhand von Abb. 9 und 10 lassen sich folgende Gesetzmässigkeiten ablesen:

1. Der Verlust an Maximalamplitude erweist sich für das Retraktogramm und das Thrombelastogramm als etwa gleich gross.

2. Streptokinase-Dosen von 10 I.E. pro Ansatz wirken sich etwa gleich stark auf die Reduktion der Maximalamplituden aus wie die höheren Dosen (15, 20 und 50 I.E. Streptokinase pro Ansatz), und zwar beträgt sie für beide Methoden 10 - 20 % der Leerwertamplituden. Offenbar ist die Beeinflussung der Maximalamplituden in diesem Bereich nicht wesentlich dosisabhängig.

Der leicht ansteigende Verlauf beider Kurven in Abb. 9 ist nicht zu verwerten, da er innerhalb der natürlichen Schwankungsbreiten der Maximalamplituden liegt (ca. 10 %).

3. Aus Abb. 10 lässt sich ersehen, dass der Amplitudenverlust nach 12 Stunden im Thrombelastogramm bei allen angewandten Streptokinase-Dosen stärker ausgeprägt ist als im Retraktogramm. Auch erweist sich der Amplitudenverlust nach 12 Stunden im Dosisbereich von 10 - 20 I.E. Streptokinase als am stärksten, während höhere Dosen (50 I.E.) keinen nennenswerten stärkeren lytischen Effekt ausüben. Eine Erklärung für die grössere Empfindlichkeit des Thrombelastographen ist nicht leicht zu geben, insbesondere, da bei Streptokinase-Überschichtung v o r Gerinnungseintritt eher eine höhere Empfindlichkeit des Retraktographen verzeichnet wurde.

Zusammenfassende Diskussion

Stellt man in einer Übersicht die Beeinflussung der Maximalamplituden durch Zusatz von Streptokinase zum Gerinnungsansatz, durch Überschichtung mit Streptokinase v o r und Nachüberschichtung n a c h Gerinnungseintritt gegenüber, so ergeben sich interessante Unterschiede in der Wirksamkeit der Streptokinase.

Aus Abb. 11 lassen sich für die Maximalamplituden im Retrakto-

gramm folgende Unterschiede der Streptokinase-Wirkung bei Zusatz zum Gerinnungsansatz (Kurve 1), bei Überschichtung v o r Gerinnungseintritt (Kurve 2) und bei Nachüberschichtung n a c h Eintreten der Gerinnung (Kurve 3) ablesen:

1. Die stärkste Reduktion der Maximalamplituden, d.h. die ausgeprägteste Abschwächung der maximalen Retraktion ergibt sich bei Zusatz der Streptokinase zum Gerinnungsansatz. Diese Tatsache ist mit der Präsenz der vollen lytischen Aktivität der jeweiligen Streptokinase-Dosis im Plasma, d.h. der Aktivität von ubiquitär im Gerinnsel durch die Streptokinase gebildetem Aktivator und Plasmin, erklärt. Bevor die maximale Retraktion eintreten kann, ist bereits ein Teil der Fibrinfasern lysiert, der Gesamtzug (Retraktion) ist vermindert.

2. Wesentlich schwächer ausgeprägt ist die Reduktion der maximalen Retraktionsamplitude bei s o f o r t i g e r Überschichtung des rekalzifizierten Plasmas mit Streptokinase. Sie wird erst deutlich bei 50 I.E. Streptokinase pro Ansatz.

3. Dagegen ist die maximale Retraktion bei Nachüberschichtung des Gerinnsels 10 Minuten n a c h Rekalzifizierung deutlicher gehemmt, als bei Überschichtung v o r Gerinnungseintritt. Bei einer Streptokinase-Dosis von 50 I.E. pro Ansatz kommt es zu einer weitgehenden Angleichung der maximalen Retraktion an die Werte, die bei Überschichtung vor Gerinnungseintritt registriert wurden. Offenbar ist dieser Effekt dosisabhängig. Für 10 I.E. Streptokinase pro Ansatz

ist die Maximalamplitude bei Zusatz der Streptokinase zum Ansatz und bei Nachüberschichtung nach 10 Minuten sogar etwa gleich gross.
Dieses auch bei den nachfolgenden Gegenüberstellungen im Thrombelastogramm zu beobachtende Phänomen bedarf einer Erklärung. Man sollte ja im Gegenteil annehmen, dass es bei sofortiger Überschichtung mit Streptokinase v o r Gerinnungseintritt zu einem stärkeren Einfluss der lytischen Aktivität der Streptokinase kommen müsste, da eine Diffusion der Streptokinase in das nicht geronnene Plasma sicher leichter ist, als eine Diffusion in ein "Gel", nämlich in das fertige Gerinnsel.

Als Erklärungsversuch bieten sich die nachfolgenden Überlegungen an:
Die zum Zeitpunkt der Entarretierung in der Überschichtungsflüssigkeit vorhandene Streptokinase-Konzentration (20 I.E.) verlangsamt die Verkürzung der Fibrinfasern, die bis zum Zeitpunkt der Entarretierung unter isometrischer Spannung standen. Die Verzögerung des Kurvenanstiegs nach Entarretierung erkennt man an den entsprechenden Kurven deutlich. Nur Streptokinase-Dosen bis zu einer bestimmten Höhe (20 I.E. pro Ansatz) üben aber diesen Soforteffekt auf die Retraktion der Fibrinfasern aus, höhere Dosen scheinen diesen Effekt nicht weiter zu steigern (50 I.E. pro Ansatz). Da zum Zeitpunkt der Entarretierung Serum aus dem Gerinnsel ausgepresst wird, kommt dieses Serum jetzt mit der gesamten nachüberschichteten Streptokinase-Dosis in Kontakt. Dabei vollzieht

sich anscheinend eine rasche Aktivierung des in dem Serum vorhandenen Plasminogens zu Aktivator und Plasmin, welche Enzyme dann eine "frontale" "äussere" Lyse des Gerinnsels auslösen und damit die maximale Retraktion bremsen. Bei der Überschichtung des Gerinnsels vor Gerinnungseintritt kommt es nicht zu der genannten schlagartigen Serumauspressung, so dass die überschichtete Streptokinase zunächst nur eine "innere" Lyse durch die Diffusion der Streptokinase in das Plasma auslösen kann. Die diffundierte Streptokinase trifft dabei nicht auf eine besondere Plasminogen-Anreicherung; bei Retraktionsbeginn, d.h. also bei Gerinnungseintritt, wird ganz allmählich Serum ausgepresst mit der Folge einer allmählichen Steigerung der Plasminogen-Konzentration, das Serum trifft auf eine geringere Streptokinase-Menge, da ein Teil bereits in das Plasma hineindiffundiert ist. Dass eine höhere Streptokinase-Dosis in der Nachüberschichtungs-Flüssigkeit (50 I.E.) keine wesentlich stärkere frontale äussere Lyse zur Folge hat, kann mit einem fast vollständigen Verbrauch des im ausgepressten Serum zum Zeitpunkt der Entarretierung vorhandenen Plasminogens durch eine Streptokinase-Dosis von 20 I.E. pro Ansatz erklärt werden. 20 I.E. Streptokinase genügen offenbar, um dieses "Plasminogen-Feuer" ausbrennen zu lassen.

Eine solche Erklärung muss nach den vorliegenden Ergebnissen hypothetisch bleiben. Drei wesentliche Tatsachen stützen diese Hypothese jedoch:

Erstens kommt es nach HARTERT (1960) bei der Entarretierung (Retraktion) zu einem Serumaustritt (wenn, wie im Retraktographen, die Bildung eines Oberflächenhäutchens des Gerinnsel durch Überschichtung vermieden wird).

Zweitens wird bei der Retraktion nach Untersuchungen von GOTTLOB und BLÜMEL (1967) der grösste Teil des im Plasma vorhandenen Plasminogens mit dem Serum ausgepresst, so dass nur ein relativ kleiner Teil des Plasminogens im Gerinnsel, an die Fibrinfasern adsorbiert, verbleibt.

Drittens geht sicher durch die sofortige Überschichtung des Plasmas mit Streptokinase ein Teil der Streptokinase für die spätere frontale Lyse durch Diffusion in das Plasma verloren.

Die genannten Vorstellungen würden den Verhältnissen in vivo wahrscheinlich auch am ehesten gerecht: MARX (1969) vermutet, dass bei der Thrombolyse in vivo eine kombinierte endogene und exogene Lyse den Gesamteffekt ausmacht.

Abb. 12 zeigt für das Retraktogramm die Amplitudenhöhe nach Ablauf von 12 Stunden bei Überschichtung vor Gerinnungseintritt (Kurve 2) und bei Nachüberschichtung nach 10 Minuten (Kurve 3). Hier ergibt sich das entsprechende Bild wie für die Maximalamplituden: bei einer Streptokinase-Dosis von 20 I.E. ist die Amplitudenreduktion nach Ablauf von 12 Stunden im Falle der Nachüberschichtung stärker ausgeprägt als bei Überschichtung sofort nach Rekalzifizierung. Bei höheren Streptokinase-Dosen (50 I.E.) tritt eine Angleichung der

Amplituden ein. Eine Gegenüberstellung der Maximalamplituden (Kurve 2 in Abb. 13 und 14) und der Amplituden nach 12 Stunden (Kurve 3 in Abb. 13 und 14) jeweils bei Überschichtung vor (Abb. 13) und nach Gerinnung (Abb. 14) zeigt, dass die Reduktion der 12-Stunden-Amplituden nicht wesentlich abweicht von der Reduktion der Maximalamplituden. Die Streptokinase entfaltet ihre lytische Aktivität also im Wesentlichen vor Erreichen der Maximalamplitude, der zusätzliche lytische Effekt nach Ablauf von 12 Stunden ist gering.

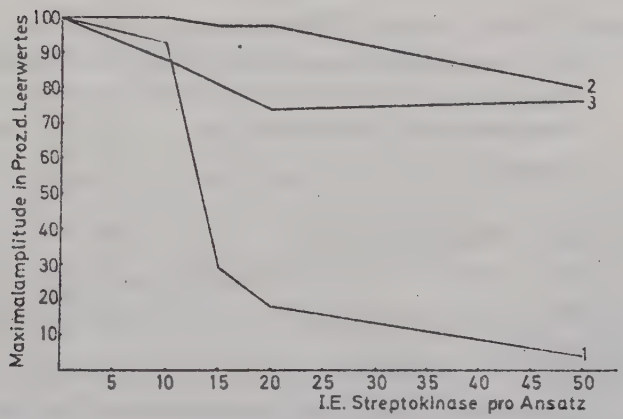

Abb. 11

Maximalamplituden im Retraktogramm
Kurve 1: Streptokinase im Gerinnungsansatz
Kurve 2: Streptokinase-Überschichtung v o r Gerinnungseintritt
Kurve 3: Streptokinase-Überschichtung n a c h Gerinnungseintritt

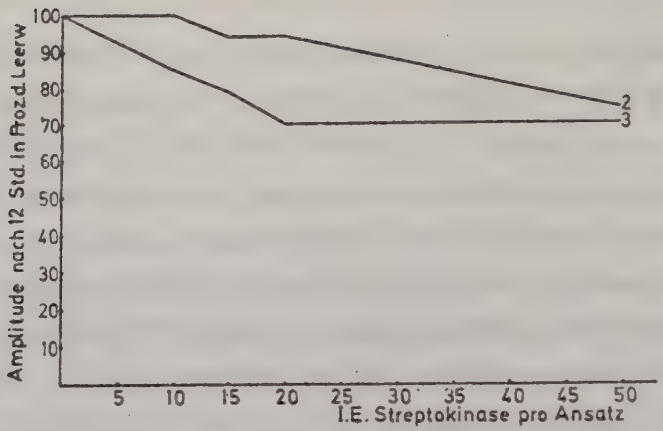

Abb. 12

Amplituden nach 12 Stunden im Retraktogramm
Kurve 2: Streptokinase-Überschichtung v o r Gerinnungseintritt
Kurve 3: Streptokinase-Überschichtung n a c h Gerinnungseintritt

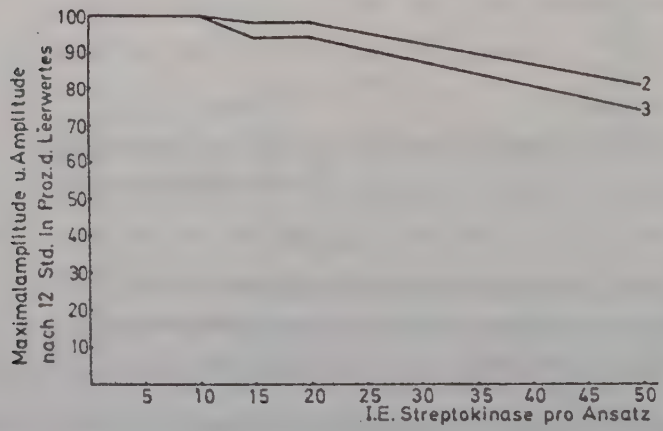

Abb. 13

Retraktogramme, Überschichtung v o r Gerinnungseintritt
Kurve 2: Maximalamplituden
Kurve 3: Amplituden nach 12 Stunden

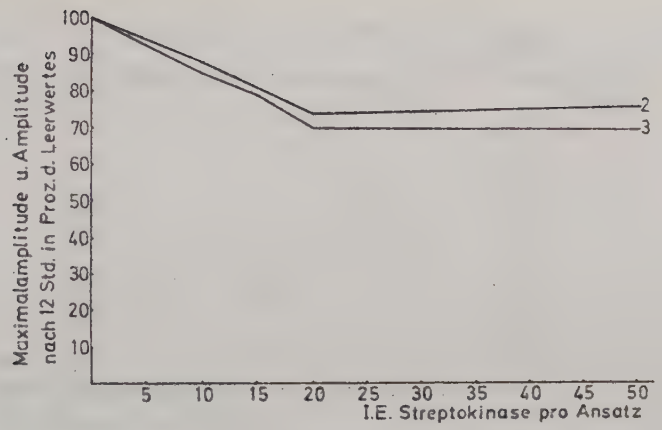

Abb. 14

Retraktogramme, Überschichtung n a c h Gerinnungseintritt
Kurve 2: Maximalamplituden
Kurve 3: Amplituden nach 12 Stunden

Ähnliche Verhältnisse ergeben sich für die Maximalamplituden der entsprechenden thrombelastographischen Untersuchen. Aus Abb. 15 ist ersichtlich, dass im Prinzip die gleichen Unterschiede bei Zusatz der Streptokinase zum Gerinnungsansatz, bei Überschichtung vor Gerinnungseintritt und bei der Nachüberschichtung nach 10 Minuten auftreten. Der Effekt der frontalen äusseren Lyse scheint dabei nicht so deutlich zur Wirkung zu kommen wie im Retraktogramm (Kurve 2 und 3 der Abb. 15 sind zusammengerückt). Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf der kleineren Kontaktfläche zwischen Gerinnsel und überschichteter Streptokinase sowie auf dem längeren Diffusionsweg in der Küvette des Thrombelastographen.

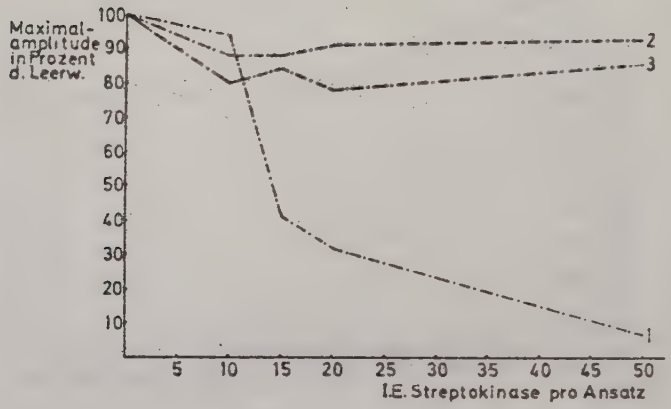

Abb. 15

Maximalamplituden im Thrombelastogramm
Kurve 1: Streptokinase im Gerinnungsansatz
Kurve 2: Streptokinase-Überschichtung v o r Gerinnungseintritt
Kurve 3: Streptokinase-Überschichtung n a c h Gerinnungseintritt

Ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den retraktographischen Untersuchungen zeigt sich im Thrombelastographen bei einer Gegenüberstellung der Amplituden nach 12 Stunden bei Überschichtung vor und nach Gerinnungseintritt (Abb. 16): bei Nachüberschichtung 10 Minuten nach Rekalzifizierung werden die 12-Stunden-Amplituden deutlich kleiner als bei sofortiger Überschichtung. Hier ist also bei der Nachüberschichtung die 12-Stunden-Amplitude nicht abhängig von der Maximalamplitude, welche Tatsache deutlich aus Abb. 18 abzulesen ist, während Abb. 17 den unwesentlichen zusätzlichen lytischen Effekt der 12 Stun-

den einwirkenden, sofort nach Rekalzifizierung überschichteten Streptokinase demonstriert (Kurve 3 Abb. 17).

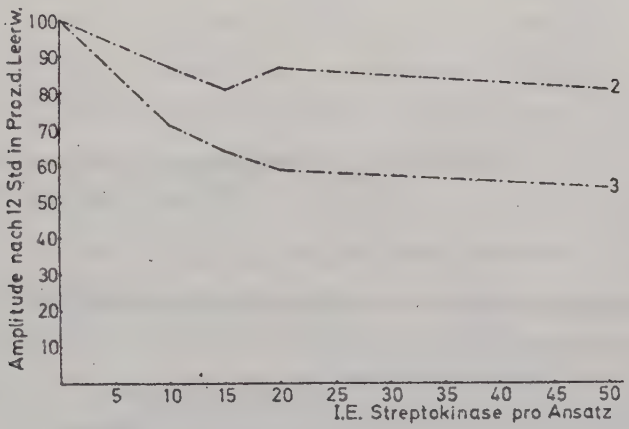

Abb. 16

Amplituden nach 12 Stunden im Thrombelastogramm
Kurve 2: Streptokinase-Überschichtung v o r Gerinnungseintritt
Kurve 3: Streptokinase-Überschichtung n a c h Gerinnungseintritt

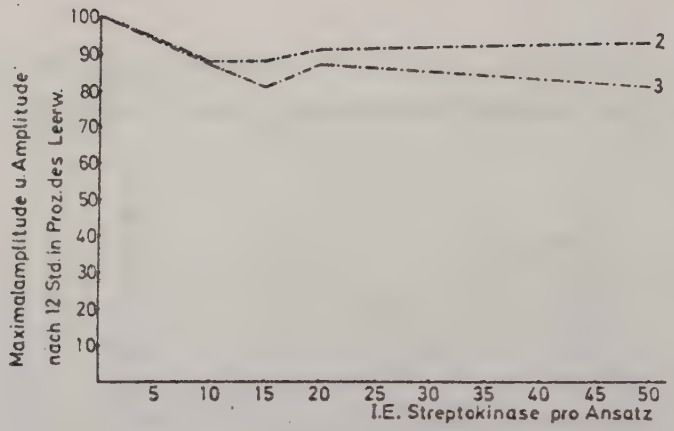

Abb. 17

Thrombelastogramme bei Streptokinase-Überschichtung v o r Gerinnungseintritt
Kurve 2: Maximalamplitude
Kurve 3: Amplituden nach 12 Stunden

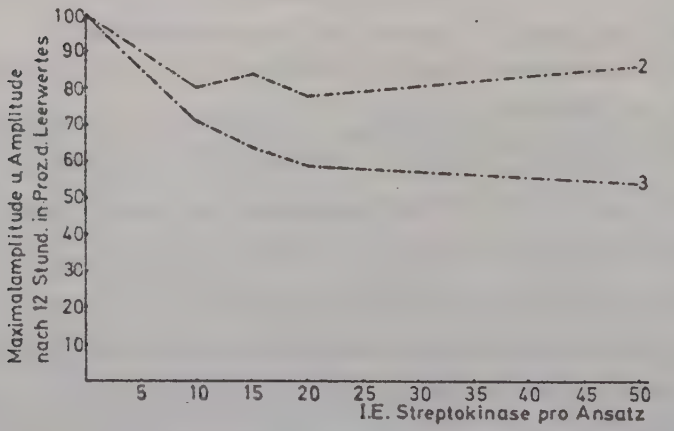

Abb. 18

Thrombelastogramme bei Streptokinase-Überschichtung n a c h Gerinnungseintritt
Kurve 2: Maximalamplitude
Kurve 3: Amplituden nach 12 Stunden

Aus dem Dargelegten ist zu schliessen, dass im Thrombelastogramm ein zusätzlicher lytischer Effekt der 10 Minuten nach Rekalzifizierung überschichteten Streptokinase nach Ablauf von 12 Stunden auftritt. Die frontal am Gerinnsel im ausgepressten Serum (analog den Verhältnissen im Retraktographen) aufgetretene Aktivator- und Plasminkonzentration verkürzt im Thrombelastogramm offenbar die Lysezeit, auch bei kleineren Streptokinase-Dosen (10, 15 und 20 I.E.) im Gegensatz zu den Untersuchungen im Retraktographen. Eine Angleichung der Werte bei höheren Streptokinase-Dosen (50 I.E.) tritt nicht ein. Ursache für diesen Unterschied könnte vielleicht die andersgeartete mechanische Beanspruchung des Gerinnsels im Thrombelastographen sein. Es erweist sich also hier die Thrombelastographie als die empfindlichere Methode im Vergleich zur Retraktographie.

4. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit durch den Fibrinolyse-Aktivator aktiviertem Plasma n a c h Gerinnungseintritt.

Eine wesentlich grössere Wirkungsintensität bezüglich der lytischen Potenz vergleichbarer Streptokinase-Dosen ergibt sich bei Nachüberschichtung des Gerinnsels mit Plasma, welches vorher mit Streptokinase inkubiert wurde.

Einige Vorversuche sollten grundsätzlich die Möglichkeit einer Nachüberschichtung des fertigen Gerinnsels mit Plasma klären; insbesondere auch deshalb, damit experimentelle Fragestellungen so bearbeitet werden konnten, dass die Methodik den Verhältnissen in vivo (Gerinnsel in Kontakt mit Blut) möglichst ähnlich war. Dabei zeigte sich, dass es sowohl bei einer Nachüberschichtung mit unverdünntem Plasma als auch mit unverdünntem Serum sofort zu einer Teilgerinnung bzw. Teilretraktion des überschichteten Plasmas bzw. des Gerinnungsansatzes in der Küvette kam. Dadurch war eine exakte Messung des Retraktionsablaufes nicht möglich. Die Erklärung für diese Tatsache liegt auf der Hand: nicht verbrauchtes Thrombin aus dem Gerinnsel in der Küvette bringt das überschichtete Plasma sofort zur Gerinnung, das ebenfalls nicht verbrauchtes Thrombin enthaltende überschichtete Serum (nicht gealtert) verursacht eine sofortige Teilretraktion des Gerinnsels in der Küvette.

Um diesen Effekt zu verhindern, erfolgte eine Heparinisierung des Plasmas oder Serums, mit dem überschichtet werden sollte.

Ansatz:

0,6 ml Citratplasma

0,1 ml physiologische Kochsalzlösung

0,4 ml Calciumchlorid

Sofortige Überschichtung des Ansatzes mit 0,25 ml physiologischer Kochsalzlösung, nach 10 Minuten Nachüberschichtung mit 0,25 ml Heparinplasma (500 I.E. Heparin/ml Plasma), das über verschieden lange Zeiten im Wasserbad bei 37°C mit 50 I.E. Streptokinase inkubiert wurde; Abdecken mit 0,5 ml Paraffinöl; Entarretierung.

Als Ergebnis eines solchen Versuches imponiert die Tatsache, dass bei einer Nachüberschichtung des Ansatzes mit Plasma, das über 70 Minuten mit 50 I.E. Streptokinase inkubiert wurde, nach 12 Stunden eine fast vollständige Lyse des Gerinnsels erreicht werden kann, während der Lysegrad bei Überschichtung mit Streptokinase allein sehr viel geringer ist.

D i s k u s s i o n

Die genannte Beobachtung lässt sich folgendermassen erklären:

1. In dem mit Streptokinase aktiviertem Plasma ist neben der Streptokinase auch noch Aktivator und Plasmin vorhanden (MARX, 1969), d.h. aktive Enzyme, die sofort wirksam werden können. Dabei spielt wahrscheinlich auch eine exogene Lyse eine gewisse Rolle (MARX, 1969).

2. Ausserdem ist anzunehmen, dass der Wirkungsverlust der Streptokinase, des Plasmins und des Aktivators im Plasma-

milieu über 12 Stunden kleiner ist als in physiologischer Kochsalzlösung (LEUBE et al, 1968).

3. Möglicherweise wirkt das vorhandene Heparin als ein Anti-Antiplasmin, indem es Alpha-2-Antiplasmin als Heparinkofaktor bindet (SCHWICK et al, 1968).

Als entscheidende Schlussfolgerung aus dem Ergebnis der letztgenannten Versuchsreihe ist die Tatsache abzuleiten, dass bei Immigration lytisch aktiver Substanzen in den Thrombus offenbar erst das Zusammenwirken von Aktivator, Plasmin und Streptokinase zu einer Thrombolyse führt, die in ihren Ausmassen vielleicht derjenigen in vivo am ehesten entspricht, während Streptokinase allein einen relativ schwachen Effekt besitzt (auch in therapeutischen Dosen).

Von der methodischen Seite her sind die letztgenannten Untersuchungen insofern interessant, als mit ihnen demonstriert wird, dass die Nachüberschichtung eines fertigen Gerinnsels grundsätzlich auch mit viskösen Flüssigkeiten wie Blutplasma ohne störende Einflüsse möglich ist.

Eine vergleichende Untersuchungsreihe mit verschiedenen Streptokinase-Dosen (10, 15, 20 I.E.) entsprechend den vorhergehenden Versuchsreihen erschien nicht sinnvoll, da eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse wegen der Verwendung von Heparin als Antikoagulans bzw. Antithrombin nicht gegeben war.

5. Prüfung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Lysierbarkeit von Gerinnseln.
Retraktographische Untersuchungen.

a) Andere Fibrinolytica.

Urokinase

Nach Einfüllen von 0,6 ml Citratplasma in die Küvette des Retraktographen wurde sofort mit 0,25 ml physiologischer Kochsalzlösung überschichtet und 10 Minuten später mit 50 Ploug-Einheiten Urokinase, gelöst in 0,25 ml physiologischer Kochsalzlösung, nachüberschichtet.

Folgende Werte wurden registriert:
Die Maximalamplitude wurde gegenüber dem Leerwert um 30% erniedrigt. Der Vergleichswert für die Amplitudenverkleinerung bei Anwendung von 50 I.E. Streptokinase liegt bei 19%. Bei Verfolgen des Lysegrades über 12 Stunden ergibt sich für Urokinase und Streptokinase in der angegebenen Dosis kein Unterschied.

Bei Zusatz von 20 Ploug-Einheiten Urokinase zum Gerinnungsansatz kommt es nach 12 Minuten 56 Sekunden zu einer vollständigen Lyse des Gerinnsels. Bei einem Vergleich der Lysezeit mit 20 I.E. Streptokinase im Ansatz ergibt sich für Streptokinase eine längere Lysezeit, nämlich 16 Minuten. (Tab. 2).

D i s k u s s i o n

Eine Vergleichbarkeit von internationalen Einheiten bei der Streptokinase und Ploug-Einheiten bei der Urokinase ist

zwar nicht gegeben, jedoch lässt sich grundsätzlich durchaus der unterschiedliche Effekt von Streptokinase und Urokinase bei Zusatz zum Gerinnsel und nachträglicher Überschichtung des fertigen Gerinnsels insofern ablesen, als offenbar die Diffusion der Urokinase in das Gerinnsel bei Nachüberschichtung etwas schlechter ist bzw. etwas längere Zeit in Anspruch nimmt als bei der Streptokinase: denn bei Zusatz der Urokinase zum Gerinnungsansatz tritt eine Lyse schneller ein als bei zahlenmässig gleich hohen Dosen Streptokinase. Der Grund hierfür kann nur eine schlechtere Diffusion der Urokinase in das Gerinnsel bei Nachüberschichtung sein. Bei einem Vergleich der Molekulargewichte beider Enzyme ergibt sich ein höheres Gewicht für Urokinase, nämlich 53 000, während Streptokinase nur ein solches von 47 000 aufweist. Dieser Unterschied könnte die unterschiedliche Diffusion erklären, wobei vielleicht ausserdem auch die Molekülgestalt eine Rolle spielen mag.

Darüber hinaus lässt sich aus diesen Versuchen schliessen, dass 20 Ploug-Einheiten Urokinase eine stärkere lytische Aktivität besitzen als 20 I.E. Streptokinase. Dieses Ergebnis entspricht den Angaben in der Literatur (SUYAMA et al., 1969). Möglicherweise spielt hier neben der unterschiedlichen Standardisierung in Internationale Einheiten und Ploug-Einheiten die Tatsache eine Rolle, dass bei der Urokinase kein Anti-Urokinase-Titer überspielt werden muss wie bei der Streptokinase ein Anti-Streptokinase-Titer, wobei Wirkung verloren geht.

Orthothymotinsäure.

DESNOYERS (1970) beschrieb kürzlich eine ausgeprägte Steigerung der lytischen Aktivität von Streptokinase bei Zusatz von Orthothymotinsäure (Natriumsalz der 6-methyl-3-isopropyl-Salizylsäure) in einer bestimmten Konzentration(0,01 bis 0,02 M). Der Wirkungsmechanismus ist bisher nicht voll aufgeklärt. Bekannt ist lediglich, dass die genannte Substanz nicht selbst proteolytisch aktiv ist, sondern wahrscheinlich auf dem Umwege über eine Aktivatorbereitstellung wirksam wird.

Folgende retraktographische Untersuchungen wurden hierzu durchgeführt:

1. Nachüberschichtung des Ansatzes 10 Minuten nach Rekalzifizierung mit 0,25 ml Orthothymotinsäure in einer molaren Konzentration von 0,02 (als Lösungsvermittler diente absolutes Äthanol 2% und 2% Cremophor EL in Aqua dest.). Hierbei zeigte sich keine Kurvenbeeinflussung gegenüber dem Leerwert (Überschichtung nur physiologische Kochsalzlösung).

2. Nachüberschichtung des Ansatzes 10 Minuten nach Rekalzifizierung mit 0,25 ml Orthothymotinsäure 0,02 M, in der jetzt 50 I.E. Streptokinase gelöst waren. Auch hier liess sich keine über das normale Mass der Streptokinase-Wirkung hinausgehende lytische Aktivität nachweisen.

3. Zusatz von 0,1 ml Orthothymotinsäure 0,02 M zu dem Gerinnungsansatz vor der Rekalzifizierung. Die Überschichtung erfolgte in üblicher Weise mit physiologischer Koch-

salzlösung. Als Ergebnis zeigte sich eine etwas niedrigere Maximalamplitude, ein gesteigerter Amplitudenverlust nach 12 Stunden war nicht nachweisbar.

4. Zusatz von 0,1 ml Orthothymotinsäure 0,02 M, in der jetzt 10 I.E. Streptokinase gelöst waren, zu dem Gerinnungsansatz vor der Rekalzifizierung. Hier zeigte sich nun eine Verkürzung der Lysezeit gegenüber dem Leerwert, d.h. ohne Orthothymotinsäure und mit 10 I.E. Streptokinase, von über 50%.

D i s k u s s i o n

Orthothymotinsäure hat also tatsächlich in einer molaren Konzentration von 0,02 einen stark potenzierenden Effekt auf die Streptokinase-Wirkung, während diese Substanz allein keinen aktivierenden Einfluss auf die lytische Aktivität des Plasmas hat. Bei einer Überschichtung des fertigen Gerinnsels mit Orthothymotinsäure zusammen mit Streptokinase tritt kein zusätzlicher lytischer Effekt ein. Offenbar wird für die Wirkung der Orthothymotinsäure Plasma benötigt und wahrscheinlich vermag sie nicht ausreichend in das Gerinnsel hineinzudiffundieren.

Das hier gezeigte Ergebnis entspricht den Beobachtungen von BAUMGARTEN und STILLER (1968), von KAULLA(1968) und DESNOYERS (1970), die an Standard-Gerinnseln eine deutliche Thrombolyse erzielten bei Anwendung normalerweise nicht thrombolytisch wirksamer Streptokinase-Dosen zusammen mit Orthothymotinsäure.

Vielleicht ergibt sich aus diesem wirkungssteigernden Effekt eines Salizylsäure-Derivates früher oder später einmal ein Ansatzpunkt für eine therapeutische Nutzbarmachung.

Von der methodischen Seite her kann anhand dieses experimentellen Beispiels gut gezeigt werden, dass eine Prüfung von Substanzen bezüglich ihrer lytischen Aktivität mit dem Retraktographen ohne Schwierigkeiten möglich ist, sogar exakter möglich ist als mit einer einfachen Beobachtung der Gerinnsel-Lyse im Wasserbad, wie sie üblicherweise praktiziert wird.

b) Antifibrinolytica

AMCHA (Aminomethylcyclohexancarbonsäure)

Zum Wirkungsnachweis der sogenannten Antifibrinolytica im Retraktogramm wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Ansatz: 0,6 ml Citratplasma
0,1 ml Streptokinase-Lösung mit 15 I.E.
0,4 ml Calciumchlorid m/40 isotonisch
Überschichtung und Nachüberschichtung nach 10 Minuten mit physiologischer Kochsalzlösung.

Ergebnis: Lysezeit 26 Minuten.

2. Ansatz: 0,6 ml Citratplasma
0,1 ml Streptokinase-Lösung mit 15 I.E.
0,4 ml Calciumchlorid
Nachüberschichtung nach 10 Minuten mit 0,25 ml

AMCHA (1:1 verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung) = 12,5 mg

Ergebnis: Nach 131 Minuten noch keine Zeichen einer beginnenden Lyse.

D i s k u s s i o n

Mit AMCHA lässt sich also bei Überschichtung eines fertigen Gerinnsels, in dem eine hohe fibrinolytische Aktivität wirksam ist, diese Aktivität vollständig blockieren.

Die gewählte AMCHA-Dosis ist als hoch anzusehen, da nach LEUBE und KUEHN (1969) bereits 0,05 bis 0,1 mg AMCHA genügen, um bei Zusatz zu einem Ansatz im Thrombelastographen mit 10 I.E. Streptokinase die Thrombolyse vollständig zu blockieren.

Vom Wirkungsmechanismus ist bekannt, dass AMCHA als Anti-Aktivator wirkt (HABERLAND, 1967; ANDERSON et al., 1966), Plasmin wird dagegen kaum inhibiert. Offenbar ist also bei den genannten Versuchen eine Aktivator-Inhibierung ausreichend für eine vollständige Blockierung der fibrinolytischen Aktivität.

Zweck dieser Versuche war aber nicht in erster Linie der genannte Wirkungsnachweis - dieser wurde schon oft genug geführt -, sondern der für die Methodik grundsätzlich wichtige Nachweis, dass bei einer nachträglichen Überschichtung eines Gerinnsels mit gelösten Substanzen eine ungestörte gleichmässige Diffusion von der Oberfläche des Gerinnsels in das Innere möglich ist. Dieser Nachweis be-

stätigt also grundsätzlich die Möglichkeit einer fehlerfreien Nachüberschichtung und einer Prüfung verschiedenster Substanzen am fertigen Gerinnsel.

Trasylol

Eine Nachüberschichtung mit dem Antiplasmin und Kallikreininhibitor Trasylol bestätigen diese Tatsache:

1. Ansatz: 0,6 ml Citratplasma
0,1 ml Streptokinase-Lösung mit 15 I.E.
0,4 ml Calciumchlorid isotonisch m/40
Überschichtung und Nachüberschichtung nach 10 Minuten mit physiologischer Kochsalzlösung

Ergebnis: Lysezeit 26 Minuten

2. Ansatz: 0,6 ml Citratplasma
0,1 ml Streptokinase-Lösung mit 15 I.E.
0,4 ml Calciumchlorid
Nachüberschichtung nach 10 Minuten mit 0,25 ml Trasylol = 2 500 KIE

Ergebnis: Lysezeit 44 Minuten

D i s k u s s i o n

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass Trasylol wie AMCHA in das Gerinnsel hineindiffundiert und dort antifibrinolytisch wirksam wird. Allerdings reicht die verwendete Trasylol-Dosis nicht aus, um eine vollständige Blockie-

rung der lytischen Aktivität zu erreichen. Bei Berücksichtigung der Angaben über die Dosis-Wirk-Relation der Antifibrinolytica AMCHA und Trasylol in der Literatur (KALLER, 1967) erklärt sich die unvollständige Blockierung mit einer Unterdosierung. Nach diesen Angaben hätten 175 000 KIE anstatt 2 500 KIE verwendet werden müssen, um den gleichen Effekt wie mit 12,5 mg AMCHA zu erreichen, da 1 mg AMCHA 1 400 KIE Trasylol wirkungsgleich sein sollen. Die unvollständige Blockierung der thrombolytischen Aktivität beruht also auf einer Unterdosierung und nicht etwa auf einer mangelhaften Überschichtung bzw. Diffusion.

c) Temperatur

Setzt man Streptokinase in vergleichbaren Dosen dem Gerinnungsansatz vor der Rekalzifizierung zu und registriert im Retraktographen bei unterschiedlich starker Küvettenbeheizung (37°C und 40°C) die Lysezeiten, so ergibt sich folgendes Bild:

Bei einer Temperatur von 40°C beträgt die Lysezeit mit einer Streptokinase-Dosis von 10 I.E. im Ansatz 10 Minuten, bei 37°C dagegen 64 Minuten, mit einer Streptokinase-Dosis von 20 I.E. im Ansatz bei 40°C 5 Minuten, bei 37°C dagegen 16 Minuten.

Bei einer Temperatursteigerung von nur 3°C kommt es also zu einer Steigerung der lytischen Potenz der Streptokinase um etwa das Dreifache, bzw. zu einer Beschleunigung des Thrombolyse-Ablaufes in der Zeiteinheit.

Inwieweit diese Beobachtungen in Zusammenhang stehen mit Untersuchungen von FISCHBACH (1960), der beim Menschen mit Pyrifer-Injektionen Fieberreaktionen auslöste und dabei "Fibrinolyse-Spindeln" im Thrombelastogramm registrieren konnte, bleibt dahingestellt. In vivo spielen hier neben der enzymaktivierenden Wärmereaktion andere Faktoren, wie Freisetzung vasogener Fibrinolyse-Aktivatoren eine Rolle. Eine Trennung dieser beiden Faktoren bezüglich ihrer Wirkungsintensität lässt sich nicht ohne weiteres vornehmen.

Bei einer Therapie mit Streptokinase kommt es erfahrungsgemäss relativ oft zu Fieberreaktionen bis über 38°C. Wenn man die genannte Temperaturwirkung in vitro auf die Verhältnisse in vivo überträgt, würde das bedeuten, dass die lytische Aktivität beim Patienten bei Auftreten von Fieber verstärkt werden könnte. Die Verlässlichkeit der in vitro bei 37°C erhaltenen Kontrollwerte während einer Streptokinase-Therapie könnte dagegen etwas eingeschränkt sein. Weitere Untersuchungen zu dieser interessanten Frage sind sicher notwendig.

d) Mechanische Beanspruchung des Gerinnsels

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde geprüft, ob eine Blockierung der Retraktion über verschieden lange Zeiträume zu einer Veränderung der Lysierbarkeit der Gerinnsel führt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst (Tab. 4).

I.E.SK pro Ansatz	Nachüberschichtung nach Min.	Entartierung nach Min.	Lysedauer in Min.
1250	10	10	133
1250	10	20	133
1250	10	30	125
1250	10	50	129

Tab. 4

Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass eine nennenswerte Beeinträchtigung der Lysezeiten durch eine zunehmend lange Blockierung der Retraktion mit zunehmender isometrischer Spannung der Fibrinfasern nicht nachweisbar ist. Damit konnte der Beweis für die Behauptung von GOTTLOB und BLÜMEL (1967), dass retrahierte Gerinnsel schlechter lysierbar sein sollen, nicht geführt werden. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung sind aber notwendig, um die einleuchtenden Argumente, wie sie GOTTLOB und BLÜMEL mit der Theorie einer sekundären Plasminogen-Aufnahme aus dem ausgepressten Serum des primär an Plasminogen verarmten Gerinnsels aufstellten, mit der retraktographischen Methode, die sich hierfür besonders anbieten würde, zu beweisen. Bei der Klärung dieser Frage ist allerdings die durch die jeweilige Methode bedingte unterschiedlich starke Retraktion der Fibrinfasern zu berücksichtigen (im Retraktographen ist das Ausmass der

Retraktion der Fibrinfasern geringer als z.B. im Reagenzglas). Dass eine entscheidende mechanische Komponente bei der Lysierbarkeit von Gerinnseln in vivo auf die Weise hineinspielt, dass mechanisch beanspruchte oder retrahierte Fibrinfasern schlechter lysierbar werden (BENECKE, 1967), erscheint eher unwahrscheinlich, wenn man folgendes Experiment berücksichtigt:

Im Thrombelastographen wurde die Drehbewegung einer Küvette durch Aushängen der zugehörigen Feder ausgeschaltet. Die Streptokinase-enthaltenden Gerinnungsansätze wurden in üblicher Weise mit Calciumchlorid zur Gerinnung gebracht und einmal mit und das andere Mal ohne Drehbewegung über Stunden beobachtet bzw. die entsprechenden Kurven registriert. Nach Wiedereinschalten der Drehbewegung in der einen Küvette kurz vor der vollständigen Lyse des von Anfang an bewegten Gerinnsels zeigte sich keinerlei Unterschied in der Lysedauer der beiden Gerinnsel. Die mechanische Beanspruchung der Fibrinfasern ist im Thrombelastographen sicherlich eine stärkere und auch etwas anders geartete (Schereffekt) als im Retraktographen. Eine Wirkung auf die Lysierbarkeit der Gerinnsel müsste sich hier wohl doch am ehesten fassen lassen. Das ist aber nicht der Fall.

Zusammenfassende Diskussion

Der letzte Abschnitt, der sich mit der Prüfung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Gerinnsel-Lyse befasst, zeigt neben den erhaltenen Ergebnissen (Diffusion und Wirkungsintensität von Urokinase; Potenzierung der lytischen Aktivität von Streptokinase durch Orthothymotinsäure; Diffusion und Wirkungsintensität der Antifibrinolytica AMCHA und Trasylol; Beschleunigung der Thrombolyse-Vorgänge durch Temperaturerhöhung; Einfluss der Streptokinase auf retrahierte und nicht retrahierte bzw. mechanisch beanspruchte Gerinnsel) die Brauchbarkeit der retraktographischen Methode für eine ganze Reihe experimenteller Fragestellungen, wobei sie als Screening-Methode für die Prüfung fraglich fibrinolytisch aktiver synthetischer Substanzen besonders gut geeignet erscheint. Sie bietet gegenüber der Prüfung dieser Substanzen an Standard-Gerinnseln im Reagenzglas (DESNOYERS, 1970; von KAULLA, 1961) mit subjektiver Bewertung des Lysegrades den Vorteil der exakten Messung und der Dokumentation fibrinolytischer Vorgänge.

Darüberhinaus wird die Exaktheit des Nachüberschichtungsverfahrens zum Zwecke der experimentellen Beeinflussung fertiger Gerinnsel am Beispiel der Antifibrinolytica besonders eindrucksvoll demonstriert.

Zusammenfassung

Thrombolytische Aktivität in einem Gerinnsel kann mit verschiedenen Methoden erfasst werden. Die Retraktographie nach HARTERT erweist sich durch die vorliegenden Untersuchungen als eine für diesen Zweck besonders geeignete Methode mit einer hohen Messempfindlichkeit, die gegen diejenige des Thrombelastographen in vergleichenden Untersuchungen abgegrenzt wird.

Nach eingehender Schilderung des methodischen Vorgehens einschliesslich eines speziellen Verfahrens, das die Überschichtung eines fertigen Gerinnsels mit Testsubstanzen und damit den Nachweis der Wirkung dieser Substanzen auf das Gerinnsel ermöglicht, werden 4 Untersuchungsreihen mit vergleichenden Versuchsansätzen im Retraktographen und Thrombelastographen beschrieben:

1. Zusatz des Fibrinolyse-Aktivators zum Gerinnungsansatz,
2. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit dem Fibrinolyse-Aktivator v o r Gerinnungseintritt,
3. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit dem Fibrinolyse-Aktivator n a c h Gerinnungseintritt (Nachüberschichtung),
4. Überschichten des Gerinnungsansatzes mit durch den Fibrinolyse-Aktivator aktiviertem Plasma n a c h Gerinnungseintritt (Nachüberschichtung).

Die vorliegende Arbeit prüft den Einfluss unterschiedlicher Dosen eines Fibrinolyse-Aktivators (Streptokinase) auf die maximale Retraktion im Retraktogramm, die maximale Thrombus-

festigkeit im Thrombelastogramm und auf die Lysezeiten im Retraktogramm und Thrombelastogramm.

Bei Zusatz der Streptokinase zum Gerinnungsansatz werden die Maximalamplituden sowohl im Retraktogramm als auch im Thrombelastogramm im Dosisbereich zwischen 10 und 15 I.E. Streptokinase pro Ansatz am stärksten reduziert. Dosen bis 10 I.E. Streptokinase verringern die Maximalamplitude nur unwesentlich. Höhere Streptokinasedosen (50 I.E.) wirken sich im Retraktogramm stärker amplitudenverkleinernd aus als im Thrombelastogramm. Hier weist das Retraktogramm eine etwas höhere Empfindlichkeit auf.

Die Lysezeiten werden sowohl im Retraktogramm als auch im Thrombelastogramm am stärksten verkürzt durch Dosen zwischen 10 und 15 I.E. Streptokinase; Dosiserhöhungen bewirken keine wesentliche Zunahme der lytischen Aktivität. Die Lysezeiten im Retraktogramm sind im Dosisbereich von 10 I.E. Streptokinase kürzer als im Thrombelastogramm, bei höheren Dosen kommt es zu einer Angleichung der Lysezeiten. Die retraktographische Methode weist also auch hier eine etwas grössere Empfindlichkeit auf.

Bei Nachüberschichtung des Gerinnsels mit Streptokinase v o r Gerinnungseintritt ergeben sich folgende Beziehungen: Die Maximalamplituden werden weder im Retraktogramm noch im Thrombelastogramm durch Streptokinase-Dosen bis 20 I.E. pro Ansatz wesentlich beeinflusst. Eine Dosis von 50 I.E. Streptokinase verkleinert die Maximalamplitude im Retraktogramm um ca. 20%, im Thrombelastogramm um ca. 7%.

Eine vollständige Lyse der Gerinnsel kann durch Nachüberschichtung mit Streptokinase nicht erreicht werden. Der Streptokinase-bedingte Amplitudenverlust nach 12 Stunden beträgt im Retraktogramm ca. 21%, im Thrombelastogramm ca. 14% (als Bezugswert gelten dabei die Maximalamplituden). Dieser Unterschied ist durch kleinere Gerinnseldicke und grössere Streptokinase-Kontaktfläche im Retraktographen bedingt.

Bei Nachüberschichtung des fertigen Gerinnsels (d.h. 10 Minuten nach Rekalzifizierung) mit Streptokinase ergibt sich für die Beeinflussung der Maximalamplituden im Retraktogramm und Thrombelastogramm kein Unterschied, die Reduktion beträgt im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Überschichtung v o r Gerinnungseintritt (ohne wesentliche Beeinflussung der Maximalamplituden) für alle angewendeten Dosen zwischen 10 und 20% der Maximalamplituden der zugehörigen Leerwerte.

Eine vollständige Lyse der Gerinnsel wird auch hier nicht erreicht, der Amplitudenverlust nach 12 Stunden ist im Thrombelastogramm etwas grösser als im Retraktogramm. Hier erweist sich die Thrombelastographie als die etwas empfindlichere Methode. Der stärkste Effekt tritt bereits bei Dosen von 20 I.E. Streptokinase pro Ansatz auf, 50 I.E. Streptokinase bewirken keine Steigerung dieses Effektes (entsprechend den Befunden bei Zusatz der Streptokinase zum Gerinnsel).

Es folgt dann eine Gegenüberstellung der erhobenen Einzelbefunde bei Zusatz der Streptokinase zum Gerinnungsansatz, Nachüberschichtung v o r Gerinnungseintritt und n a c h Gerinnungseintritt. Das Ergebnis, dass die Reduzierung der Maxi-

malamplituden bei Überschichtung mit Streptokinase n a c h Gerinnungseintritt stärker ist, als bei Überschichtung v o r Gerinnungseintritt, wird eingehend besprochen.

Bei einer Überschichtung des Gerinnungsansatzes mit durch Streptokinase aktiviertem Plasma n a c h Gerinnungseintritt ergibt sich eine starke Potenzierung der lytischen Wirkung im Vergleich zur Anwendung von Streptokinase allein. Endogene und exogene Thrombolyse kombinieren sich hier in einem Modell der in vivo-Verhältnisse, wie sie sich vermutlich bei therapeutischer Anwendung von Streptokinase ergeben.

Eine letzte Untersuchungsreihe prüft den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Lysierbarkeit von Gerinnseln.

1. Es ergibt sich eine gute Wirksamkeit von Urokinase im Gerinnsel, jedoch eine im Vergleich zur Streptokinase etwas schlechtere Diffusion von Urokinase in ein fertiges Gerinnsel.

2. Durch Orthothymotinsäure kommt es zu einer deutlichen Wirkungssteigerung des Streptokinase-Effektes.

3. Am fertigen Gerinnsel wird die antifibrinolytische Wirkung von AMCHA und Trasylol demonstriert.

4. Durch Temperatursteigerung lässt sich eine Beschleunigung der thrombolytischen Vorgänge nachweisen.

5. Durch mechanische Beanspruchung der Fibrinfasern (d.h. retrahierte Gerinnsel im Retraktographen und auf Scherwirkung beanspruchte Gerinnsel im Thrombelastographen) wird ihre Lysierbarkeit nicht geändert.

Die Bedeutung der erhobenen Befunde für die Anwendbarkeit der retraktographischen Methode bei einer Prüfung fibrinolytisch und antifibrinolytisch wirksamer Substanzen wird diskutiert.

D) Literaturverzeichnis

Ambrus, T., G. Markus: Plasmin-Antiplasmin complex as a reservoir of fibrinolysis enzyme. Amer.J.Physiol. 199:491 (1966)

Anderson, L., I.M. Nilsson, S. Colleen, B. Granstrand, B. Melander: Conference on chemistry, pharmacology an clinical applications of the proteinase inhibitors. New York Academy of Sciences, New York 12. - 13. 9. 1966

Astrup, T.: Fibrinolysis. Acta haemat., 7:271 (1952)

Astrup, T.: The biological significance of fibrinolysis. Lancet II:565 (1956)

Baumgarten, W., D. Stiller: Proceedings of the Twelfsth International Congress of Hematology, New York, 1968

Beck, E., R. Schmutzler, F. Duckert: Composion of epsilon-amino-caproic acid and kallikrein inhibitor. Thromb. Diathes. Haemorrh. 10:106 (1963)

Beneke, G.: Der Thrombus als pathologisch-anatomisches Substrat. Internat. Symposion über therapeut. und experiment. Fibrinolyse, Ulm 1967, F.K. Schattauer-Verlag Stuttg. 1967

Desnoyers, P.C.: Chemical control of Fibrinolysis-Thrombolysis. Theory and Clinical applications, Wiley-Intersience, New York (1970)

Deutsch, E.: Die endogene und exogene Auslösung der Fibrinolyse. Internat. Symposion über therapeut. und experiment. Fibrinolyse, Ulm 1967, F.K. Schattauer-Verlag Stuttg. 1967

Dudok de Wit, C.: The role of plasminogen in fibrinolysis. Vox sang. 7:526 (1962)

Fischbach, W.: Beitrag zur Fibrinolyse. Inaug.Diss. Zürich 1960

Gottlob, R., G. Blümel: Studies on thrombolysis with streptokinase; 1. On thrombembase of streptokinase. Thrombos. Diathes. haemorrh. 19:94 (1968)

Gottlob, R., G. Blümel: Über den Nachweis der Plasminogenverarmung in retrahierten Vollblutgerinnseln und über die Bedeutung dieses Vorgangs für die Lysierbarkeit mit Streptokinase. Thrombos. Diathes. haemorrh. 15:570 (1966)

Gottlob, R., G. Blümel: Mechanismen der Thrombolyse mit Streptokinase bei Thromben verschiedenen Alters. Internat. Symposion über therapeut. und experiment. Fibrinolyse, Ulm 1967, F.K. Schattauer-Verlag Stuttg. 1967

Gross, R.: Findings with labeled streptokinase in vivo and in vitro. 9th Congress Soc. Europ. Haemat. Lissabon 1963

Haberland, G.L.: Enzyminhibitoren und Blutgerinnung. Monatskurse ärztl. Fortbildung 12:623 (1967)

Hartert, H.: Apparatus for measurement of retraction of blood clots, "Flow properties of blood". Pergamon Press, Oxford 1960, S. 375

Hawkey, C.M., J.L. Stafford: A standard clot method for the assay of plasminogen activators, anti-activators and plasmin. J. clin. Pathol. 17:175 (1964)

Hedner, U., I.M. Nilsson: Termination of plasminogen in clots and thrombi. Internat. Symposion über therapeut. und experiment. Fibrinolyse, Ulm 1967. F.K. Schattauer-Verlag, Stuttg. 1967

Heimburger, N.: Neuere Erkenntnisse über den Mechanismus der Fibrinolyse. Behring-Werke-Mitteilungen 41:84 (1962)

Kaller, H.: Pharmakologie des Trasylol. Neue Aspekte der Trasylol-Therapie 2, F.K. Schattauer-Verlag, Stuttg. 1967

von Kaulla, K.N.: The Standard Clot. Thromb. Diathes. Haemorrh. 5:489 (1961)

von Kaulla, K.N.: Proceedings of the Twelfth Internat. Congress of Hematology (New York, 1968)

Kline, D.L.: Interaction of streptokinase and plasminogen to form an SK-plasmin activator of plasminogen. 8th Congress Soc. Europ. Haematol., Lissabon 1963

Krießmann, A.: Retraktographische Untersuchungen zur Retraktion. Inaug. Diss., Heidelberg 1962

Lesuk, A., L. Terminiello, J.H. Traver, J.L. Groff: Cristalline human urokinase: some properties. Science 147:880 (1965)

Leube, G., J.J. Kuehn: Beeinflussung der fibrinolytischen Aktivität durch trans-AMCHA. Med.Welt 20:1846 (1969)

Leube, G., J.J. Kuehn: Vereinfachtes Verfahren der Fibrinolyse beim Herzinfarkt. Ärztl.Praxis 56:2568 (1968)

Ludwig, H.: Thrombolyse durch Streptokinase. Dtsch.Med.Wschr. 89:1105 (1964)

Maki, M., F.K. Beller: Comparative studies of fibrinolytic inhibitors in vitro. Thromb.Diathes.Haemorrh. 16:668 (1966)

Marx, R.: Grundlagen der Fibrinolyse-Therapie. Symp. "Fibrinolyse-Therapie", Hamburg 1969, F.K. Schattauer-Verlag Stuttg. 1969

Marx, R.: Kallikreininhibitoren als Gerinnungshemmstoffe. Neue Aspekte der Trasylol-Therapie 2, F.K. Schattauer-Verlag Stuttg. 1968

Ogston, D., M. Ogston, H.W. Fullerton: The plasminogen content of thrombi. Thrombos. Diathes. haemorrh. 15:220 (1965)

Schmutzler, R., E. Beck: Die Wirkung der 6-Aminocapronsäure und des Trasylols auf die Fibrinolyse. Schweiz.Med.Wschr. 92:1368 (1962)

Schwick, H.G., N. Heimburger: Biochemie der Fibrinolyse. Int.Symp. über experiment. und therapeut. Fibrinolyse, Ulm 1967, F.K. Schattauer-Verlag Stuttg. 1967

Schwick, H.G., N. Heimburger: Biochemie der Antithrombine. 12. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung, Deidesheim 1968, F.K. Schattauer-Verlag Stuttg. 1971

Spöttl, F., R. Constantini: Die Bedeutung des Proaktivators im fibrinolytischen Fermentsystem. Thrombos. Diathes. haemorrh., 18:416 (1967)

Suyama, T., S. Odashima, Y. Iga, et al.: Thrombolytic effect of urokinase on artificial thrombi in vitro. Kobe. J. Med. Sci. 15:137 (1969)

Tillet, S., R.L. Garner: The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. J. exp. Med. 68:488 (1933)

Lebenslauf

Am 2. 5. 1934 wurde ich als Sohn des Bankangestellten Paul Kuehn und seiner Ehefrau Klara Kuehn geb. Bauer in Frankfurt/Main geboren.

Mit Unterbrechung eines 4-jährigen Schulbesuches in Kassel leistete ich meine Schulzeit in Frankfurt/Main ab, wo ich 1956 die Reifeprüfung ablegte.

1956 begann ich mit meinem Medizinstudium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/Main, an der ich 1962 das Staatsexamen bestand.

Die anschliessende Medizinalassistentenzeit leistete ich zum grössten Teil im Stiftungskrankenhaus Nördlingen ab und wechselte dann an das Städt. Krankenhaus Kaiserslautern über. Seit 1964 gehöre ich der Medizinischen Klinik des Städt. Krankenhauses Kaiserslautern an.

1970 erhielt ich meine Anerkennung als Facharzt für Innere Medizin.